



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: Преработка и контрола на земјоделските производи

Модул: Преработка и контрола на анимални производи

Штип

Зоран Арсеvски

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

МАГИСТЕРСКИ ТРУД

Штип, 2019 година

Зоран Арсевски

КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНА И ОДБРАНА НА МАГИСТЕРСКИ ТРУД

Ментор:

Вон.проф. д-р Сања Костадиновиќ Величковска

Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Член:

Доцент д-р Фиданка Илиева

Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Член:

Проф. д-р Ацо Кузелов

Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Датум на одбрана: 21.02.2019

Зоран Арсевски

Апстракт

Овој труд претставува увид на бројот на бактериите и соматските клетки, како и присуство на афлатоксинот М1 (AFM1), како индикатори за квалитет на суровото млеко од Овчеполскиот Регион. За потребите на ова истражување е спроведена анализа на 1320 примероци за присуство на бактерии во сурово млеко, 479 примероци за присуство на соматски клетки во период од јануари 2018 година, до јуни 2018 година и 60 примероци за присуство на афлатоксин М1. Резултатите индицираат дека само 10,45% од мострите од млекото ја задоволуваат националната легислатива и параметрите кои се дадени во истата. Според европските стандарди за квалитет на млеко, присуството на бактерии не го задоволува стандардот, додека параметрите за соматски клетки се на задоволувачко ниво со 95,5%. Присуството на афлатоксин М1 беше предмет на анализа за време на инцидентот со микотоксинот во периодот од март 2013 година, до ноември 2014 година. Мострите беа анализирани за AFM1 со ELISA и со HPLC флуоросцентен детектор како конфирмирачки метод. Концентрациите на AFM1 го надминаа максимумот на дозволените нивоа во 2 примерока, а највисоко детектираната концентрација беше 0,58 mg/kg

Од направените анализи кај млекопроизводителите кои беа предмет на анализа во овој труд, може да се заклучи дека истите не се придржуваат кон добрата земјоделска пракса, нивото на контаминација на млекото е на високо ниво, што е резултат на: недоволна хигиена, неправилно постапување со млекото после молзење и недоволна едукација на фармерите за хигиената во примарното производство.

Клучни зборови: Афлатоксин М1, Афлатоксин Б1, број на соматски клетки, број на бактерии, млеко, ELISA, HPLC-FD

Зоран Арсевски

Abstract

This paper presents an insight into the number of bacteria and somatic cells, as well as the presence of Aflatoxin M1 (AFM1) in raw milk as an indicator of milk quality selected from the Ovche Pole region. For the purpose of this research, an analysis of 1320 samples of the presence of microorganisms in milk was made, 479 samples for the presence of somatic cells in the period from January 2018 to June 2018. The results indicate that only 10.45% of the milk samples satisfy the national leaflet and the parameters given therein. According to European milk quality standards, the presence of bacteria does not meet the standard, while the parameters for somatic cells are at a satisfactory level of 95.5%. The presence of aflatoxin was the subject of analysis during the mycotoxin incident in 2013 and the number of tested samples was 60, which was collected from March 2013 to November 2014. They were analyzed for AFM1 with ELISA as a projection and a HPLC fluorescent detector, such as Confirmation method. AFM1 concentrations exceeded the maximum permitted levels in 2 samples, and the highest detected concentration was 0.58 mg/kg.

From the analyzes carried out by the small producers that were the subject of analysis in this paper, it can be concluded that they do not adhere to the good agricultural practice, the level of contamination of the milk is at a high level due to insufficient hygiene, improper handling of milk after milking and insufficient education of farmers for hygiene in primary production.

Keywords

Aflatoxin M1, Aflatoxin B1, Milk, number of somatic cells, number of bacteria, ELISA, HPLC-FD

Зоран Арсевски

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД.....	7
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА.....	10
2.1. Фактори за појава на бактерии во суровото млеко.....	10
2.1.1. Контаминација со микроорганизми од вимето	11
2.1.2. Контаминација со микроорганизми од надворешноста на вимето.....	12
2.1.3. Влијание на одржување на опремата и процедурите за санитација.....	13
2.1.4. Температура и време на чување на млекото.....	14
2.1.5. Вода.....	15
2.2. Соматски клетки.....	16
2.2.1. Маститис.....	18
2.2.2. Контролни програми за маститис.....	19
2.2.3. Главни предизвикувачи зарази и патогени.....	24
2.2.4. Влијание на маститисот врз составот и квалитетот на млекото.....	25
2.2.5. Економски ефекти на маститис.....	27
2.3. Афлатоксинот M1	28
2.3.1. Формирање, токсичност, и регулација на афлатоксинот M1.....	31
2.3.2. Извор на афлатоксини во земјоделски производи.....	34
2.3.3. Продукција на афлатоксин.....	35
2.3.4. Физички и хемиски својства на афлатоксини.....	36
2.3.5. AFM1 во млекото.....	37
2.3.6. Ефект на преработка на млеко врз содржината AFM1.....	39

Зоран Арсевски

2.4. Техники за детекција.....	40
2.4.1. Имунолошки методи.....	45
2.4.2 Ензимски имуносорбент (ELISA).....	47
3. Цел на Истражувањето.....	50
4. Материјали и метод.....	50
4.1. Земање примероци.....	50
4.2. Анализа на вкупен број соматски клетки и број на микроорганизми.....	51
4.3. Анализи на Афлатоксин М ₁ кај сировото млеко со ELISA.....	52
4.4. Анализа на афлатоксин М ₁ кај сировото млеко со HPLC-FD.....	52
5. Резултати и дискусија.....	53
5.1. Број на микроорганизми (БМО).....	54
5.2. Број на соматски клетки (БСК).....	61
5.3. Афлатоксин М ₁	68
6. Заклучок.....	69
7. Прилози.....	70
8. Користена литература.....	84

Зоран Арсевски

1. ВОВЕД

Млекото е основен прехранбен продукт за најранливите категории на населението (бебиња, деца и стари лица). Тоа е богато со висококвалитетни протеини и обезбедува внес на десет есенцијални аминокиселини. Млекото обезбедува: енергија, имуноглобулини, и други микронутриенти (FAO, 1997).

Млекото содржи адекватни количества на: протеини, масти, шеќери, витамини и минерали. Кравјото млеко е доминантен вид, но исто така се консумира и млеко од коза, биволи, овци и камили (FAO, 1997).

Генерално, млекото може да се смета како емулзија на млечните масти растворени во водена фаза, заедно со други материи во колоидна форма. Комерцијалното млеко може да се класифицира во две главни групи: течно млеко или млеко во прав (FAO, 1997).

Иако млекото е добар извор на многу хранливи материи, може да биде извор и на токсични супстанции, како што е афлатоксин M1 (AFM1) (Stoloff, 1980).

Афлатоксините се група на токсини произведени од страна на габи, како што е *Aspergillus flavus* (Kamkar, 2005). Нивното присуство во млекото е поврзано со исхрана на добитокот со храна контаминирана со афлатоксин Б1 (AFB1), а истиот потоа се метаболизира и излучува во млекото како AFM1 (Prandini et al., 2008). Афлатоксинот е поврзан со токсичност и канцерогеност кај човекот и животните (Verma, 2004). AFM1 е исто така познат и како хепатотоксичен и канцероген (Bullerman, 1979). AFM1 - токсинот останува стабилен и кога млекото е термички обработено. Според досегашните истражувања, не постои доказ дека во ладилници со концентрирање или сушење на млекото се менува нивото на AFM1 (Park, 2002).

Зоран Арсевски

Констатирано е дека контаминацијата на млекото и млечните производи со AFM1 прикажува варијации според географската положба на земјите и различни сезони. Нивото на контаминација со AFM1 е диференцирано од топли и ладни сезони, и се должи на фактот дека исхраната со трева од пасишта почесто се применува во пролет и лето, отколку во зима (Battilani, 2004). Кон крајот на летото повеќе се консумира свежа храна во однос на концентрирана храна, предизвикувајќи намалено ниво на AFM1 во млекото (Galvano et al, 1996. Pittet, 1998; Sarimehmetog et al., 2003).

За време на инцидентот со микотоксинот во 2013 година, од страна на Институтот за ветеринарна медицина - Скопје, научниот труд на Димитријевиќ-Стојковска индицирал присуство на афлатоксинот M1 (AFM1) во суровото млеко на територијата на Република Македонија. Вкупниот број на тестирани примероци бил 3635, селектирани од февруари 2013 година, до јануари 2014 година. Примероците биле анализирани за AFM1 со ELISA и со HPLC со флуоросцентен детектор како конфирмирачки метод. Концентрациите на AFM1 го надминале максимумот на дозволените нивоа со 2,9% од примероците, а највисоко детектираната концентрација била 408.1 ng/kg. (Dimitrieska-Stojkovic et al.2016)

Во Македонија се применува Правилникот за општите барања за безбедност на храната, со кој максимално дозволеното ниво на афлатоксин M1 во млекото изнесува 0,05 mg/kg. Правилникот е усогласен со европските стандарди кои се едни од најригорозните, кога е безбедноста на храната во прашање и гарантираат високо ниво на заштита на потрошувачите.

Како параметри за оценување на квалитетот на млекото и оценување на хигиенската исправност веќе подолго време се користат: бројот на соматските клетки и бројот на бактерии.

Зоран Арсевски

Според Правилникот за изменување на правилникот за посебни барања за безбедност и хигиена и начинот на постапката за вршење на службените контроли на млеко и млечни производи (Службен весник на РМ, бр.26 од 21.2.2012 година), се предвидува во периодот од 2013 до 2016 година бројот на бактерии да се намали од 800 000/мл до 100 000 на мл, а бројот на соматските клетки од 600 000/мл на 400 000 /мл. Со постигнување на овие вредности, би биле задоволени стандардите кои моментално важат во земјите членки на ЕУ, ЕС853/2004.

И покрај насоките од Европската Унија, во Република Македонија е донесена нова регулатива за квалитет на суровото млеко. Според Правилникот за изменување на Правилникот за посебни барања за безбедност и хигиена и начинот на постапката за вршење на службените контроли на млеко и млечни производи (Службен весник на РМ, бр. 197 од 28.10.2016 година), препораката треба да се спроведе во целост, а процесот на категоризација треба да заврши до 2020 година. Целта е унапредување на квалитетот на суровото млеко, од аспект на вкупен број бактерии и соматски клетки, согласно европската регулатива. Сите фарми што нема да ги исполнат дефинираните критериуми и што ќе влезат во т.н. *трета категорија*, нема да можат да го предаваат млекото за откуп и натамошна преработка. Фармите од втора категорија, пак, ќе можат да го предаваат млекото само за преработка на сирење *со зреење од најмалку 60 дена*.

Категоризацијата на фармите со молзни грла се врши според бројот на соматски клетки и вкупниот број на бактерии во млекото, согласно ЕУ регулативата за квалитетот на суровото млеко. Во првата категорија спаѓаат фармите каде бројот на соматски клетки во млекото е помал или еднаков на 400.000 во милилитар млеко, а вкупниот број бактерии е до 100.000. Фармите кои произведуваат млеко со соматски клетки и бактерии над дефинираните, се втора или трета категорија. Крајниот рок за постигнување на европските стандарди за

Зоран Арсевски

сурово млеко се одложуваше неколку пати. Границата на соматски клетки и бактерии беше флексибилна, но не се исполнуваше.

Поради горенаведеното, целите на истражувањето во оваа магистерска теза се: вкупниот број на бактерии (ВББ) и соматски клетки (ВБС), како и присуството на афлатоксинот во сурово млеко произведено од индивидуални фармери од Овчеполскиот Регион во Република Македонија.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

2.1. Фактори за појава на бактерии во суровото млеко

Млекото се синтетизира во специјални клетки за таа намена во млечната жлезда и во моментот на секреција од алвеолите во вимето млекото е стерилно. Откако ќе заврши оваа фаза, се зголемуваат условите за контаминација на млекото. Суровото млеко е еден од најсоодветните медиуми за раст на широк спектар на бактерии, особено веднаш по молзењето, кога тоа е речиси на телесната температура. Сепак, млекото содржи природен инхибиторен систем, кој значајно го спречува порастот на бројот на бактерии во текот на првите 2-3 часа. Ако млекото се лади во овој период на 4°C, тоа го задржува својот оригинален квалитет (Van Schaik et al., 2005).

Навременото ладење гарантира дека квалитетот на млекото останува добар за обработка и потрошувачка. Вкупниот број на бактерии во свежото сурово млеко треба да биде помал од 50.000 на милилитар млеко. За да се спречи преголемото размножување на бактериите, млекото треба да се произведува во што е можно похигиенски услови и треба да се лади или да се загрее во што е можно пократок период.

Болните крави преку млекото можат да лачат патогени бактерии. Затоа суровото млеко може да биде опасно за потрошувачот, и некои од болестите, како

Зоран Арсевски

што се: туберкулоза, бруцелоза и антракс, може да се пренесат директно на потрошувачот (O'Reilly et al., 2006; Pal et al., 2007).

Иако постои варијација во праксата при производство на млеко во светот, во повеќето развиени земји млекото се собира со машинско молзење и се пренесува во резервоари за складирање во фрижидер, каде што се чува пред транспортот.

Постојат повеќе фактори, кои предизвикуваат промена во микрофлората на суровото млеко. Посебно важна е здравствената состојба на животното, хигиената и околината во која се молзат кравите, процедурите за чистење на опремата, чувањето на млекото од моментот на молзење до предавање на млекарата или консументите, температурата на која се чува млекото, времето на чување итн. Сите горенаведени параметри се услов за спречување или намалување на ризикот за контаминација со бактерии на млекото и зголемување на нивниот број.

Присуството на бактерии на млекото може да се класира на повеќе начини:

- од самото виме
- од надворешноста на вимето
- процедурите за санитација на опремата
- температура и време на чување на млекото и
- квалитетот на водата што се користи при санитацијата.

2.1.1. Контаминација со бактерии од вимето

Суровото млеко при молзење кај здрави крави содржи низок процент на бактерии, или помалку од 1 000 во мл, додека кај кравите кои се заболени од маститис, бројот на бактериите е еноормно зголемен и зависи од сојот на

Зоран Арсевски

патогените, фазата на инфекцијата и процентот на заболени грла. Инфицираните грла имаат потенцијал да излучуваат преку 10 0000 000 бактерии во мл.

Маститисот е дефиниран како воспаление на млечната жлезда или вимето. Тоа воспаление може да биде: супклиничко, при кое не постојат видливи знаци на инфекција, потоа клиничко, каде постојат знаци на инфекција, или пак хронично, кога симптомите перзистираат во подолг временски период. Најчестите бактерии кои предизвикуваат маститис се: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* и *Escherichia coli*.

Присуството на патогени бактерии во млекото не секогаш е показател дека животните се заболени со маститис.

Освен микроорганизми кои предизвикуваат маститис, други бактерии кои се патогени за луѓето и можат да го заразат вимето се: *Mycobacterium bovis*, што може да предизвика туберкулоза кај луѓето (Griffths, 2007), *Brucella abortus* (предизвикувач на бруцелоза или нелулантна треска), *Listeria monocytogenes*, *Coxiella burnetii* and *Salmonella* spp. (Pal, 2007). На пример, *C. Burnetii* не предизвикува клиничка болест кај говедата, но предизвикува Q-треска кај луѓето (Kim et al., 2005).

2.1.2. Контаминација со микроорганизми од надворешноста на вимето

На надворешноста на вимето се наоѓаат микроорганизми кои се поврзани со средината во која се чува и молзе животното и микроорганизми кои имаат контакт со самата кожа на животното. Директното влијание на овие

Зоран Арсевски

микроорганизми не се смета како фактор на контаминација бидејќи тие се сметаат за природни жители и не се размножуваат во млекото.

Значително поголемо влијание имаат оние микроорганизми кои се наоѓаат во постелката, фецесот, храната и калта во која лежат животните, и вршат директна контаминација на вимето и боските.

Микроорганизми кои се наоѓаат во постелката во шталите најчесто се: стрептококи, стафилококи, колиформни, спорогени бактерии и други грам-негативни микроорганизми. Многу често на надворешноста на вимето може да се констатираат и термофилни бактерии кои се отпорни на високи температури, ја преживуваат пастеризацијата и психрофилни соеви на бактерии кои растат на ниски температури. Сето ова укажува на фактот дека надворешната контаминација на вимето може да има огромно влијание врз вкупниот број на бактерии. (Bramley and McKinnon. 1990).

Студијата за факторите на ризик, поврзана со контаминација на сурово млеко од млечни форми на *Listeria monocytogenes*, покажала дека недоволната чистота на кравите, несоодветното осветлување на молзилиштата и плевните може да биде индикација за занемарување на хигиената на молзење. Несоодветната дезинфекција на крпите кои се користат за сушењето на вимето може значително да ја зголеми веројатноста за контаминација (Sana et al., 2003).

Силажата е исто така важен извор на контаминација со *Listeria spp.*, вклучувајќи *L. monocytogenes* и други потенцијални човечки патогени, како *Yersinia enterocolitica* и *Aeromonas hydrophila* (Sana et al., 2003).

2.1.3. Влијание на одржување на опремата и процедурите за санитација

Неправилните процедури за чистење на опремата и степенот на хигиена на системот за молзење е еден од најбитните фактори, кој има влијание на вкупниот

Зоран Арсевски

број на микроорганизми. Остатоците од млеко на контактните површини на опремата создаваат услови за раст на огромен број на микроорганизми.

Исто така, остатоците на млеко во системот за молзење се добар медиум за понатамошен развој на микроорганизмите. Старите гумени и напукнати делови од опремата се сметаат за добар извор на термофилни бактерии. Разни бактериски видови може да дојдат во контакт со млекото од минералните наслаги присутни во опремата за молзење и најверојатно најважните од нив се грам-негативните психотрофи, кои доминираат меѓу микрофлорите кои се детектираат на цевките од нерфоусувачки челик што се користат за пренос на млеко (Griffiths, 2004).

Разликите во начинот за чистење од фарма до фарма имплицираат значителна варијација во микрофлората на опремата за молзење. Единствената вистинска заштита од бактерии на опремата за време на молзењето е адекватната санација. Начинот на чистење на пониски температури и некористењето на хемиски средства за дезинфекција доведува до зголемен раст на грам-негативни микроорганизми, колиформни и млечни стрептококи. Микробиолошката контаминација на апаратите за молзење не зависи само од санитарната постапка, туку и од многу други фактори, како што се: постапките за молзење и животната средина во просторијата за молзење (Feldman et al., 2006).

2.1.4. Температура и време на чување на млекото

Чување на млекото на ниска температура има за цел да се стопира растот на останатите микроорганизми, а истовремено и го минимизира присуството на психрофилните бактерии и нивното позначајно учество во вкупниот број на микроорганизми, кои во понатамошната термичка обработка на млекото нема да ја преживеат пастеризацијата. При температури на чување на млекото над 6°C се

Зоран Арсевски

овозможуваат услови за развој на огромен број на микроорганизми. Слабото ладење на млекото често е поврзано со развој на стрептококи, кои ја зголемуваат киселоста на млекото и често резултира со појава на непријатен мирис. Температурата на чување над 15°C е најпогодна за развој на овој вид на бактерии (Gehring, 1980). Типот на бактериската популација која преовладува во вкупниот број на микроорганизми, сепак зависи од микрофлората на суровото млекото.

2.1.5. Вода

Водата што се користи при производството на млеко треба да биде квалитетна и за пиење. Резервоарите за чување треба да бидат заштитени, за да се спречи пристапот на инсекти, глодари, птици и други извори на контаминација и опремата што се користи за испорака на вода треба да се исчисти соодветно. Проблемите можат да се појават кога водоснабдувањето не е соодветно третитано, а се користи за плакнење и миење на опремата. Таквата вода може да содржи разновиден спектар на микроорганизми, вклучувајќи: *Pseudomonas spp.*, *Coliforms*, *Bacillus spp.* и бројни други видови на бактерии (Bramley and Mckinnon, 2004).

Истражувањата на Perkins et al. (2007) покажаа потенцијал за контаминација на млекото со *E. coli* преку миење на опремата со вода. Бројот на микроорганизмите во водата што го загадуваат млекото можеби е мал, но тие имаат потенцијал за раст во кој било остаток на вода што останува на опремата. Затоа се препорачува претходно хлорирање на водата што се користи при производството на млеко. Во последниве години зголемена е присутноста на *Cryptosporidium parvum* во нетретирана вода. Тоа е паразит кој предизвикува *криптоспоридиоза*, болест на цревниот тракт на цицачите, што резултира со акутна, водена и некрвава дијареа. Криптоспоридиозата е особено загажувачка

Зоран Арсевски

кај имунокомпромитирани пациенти (како што се пациенти со СИДА), кај кои со дијареата може да загуби од 10 до 15 литри вода дневно. Познато е дека ооцистите на овој паразит се спротивставуваат на хлорирање и се откриени во сурово млеко иако со ниски стапки на инциденца ($<1\%$), но нивниот извор е неопределен (Perkins et al. 2007).

2.2. Соматски клетки

Соматските клетки се нормален дел од млекото, како негова природна состојка, и кај здравото виме не влијаат на неговиот состав и физичко-хемиските карактеристики (Natzke, Everett and Postle, 1972).

Соматските клетки се состојат од многу видови на клетки, вклучувајќи: полиморфонуклеарни леукоцити (ПМН), макрофаги, лимфоцити, еозинофили и разни епителни клетки од млечната жлезда. Клетките во млекото од здраво виме се претежно претставени од епителни клетки кои се по потекло од крвта (леукоцити). Од вкупниот број, 70% се епителни клетки на вимето (кожата, млечните канали и млечната цистерна), а остатокот од 30% го сочинуваат клетките од крвта. Вкупниот број на соматски клетки и процентуалната застапеност на поедините клеточни популации зависат од стадиумот на лактација, инфективниот стадиум на млечната жлезда, како и од некои физиолошки амбиентални фактори. Просечниот број на соматски клетки во млекото добиено од здрава млечна жлезда е 50 000/мл, а во најголем број од случаите тој е понизок од 150 000/мл и во него доминираат макрофаги и лимфоцити, а неутрофилите и епителните клетки се застапени во помал процент (Burvenich, Guidry & Paape 1995).

Зоран Арсевски

Зголемувањето на бројот на соматски клетки се должи на активација на имунолошкиот систем, кога доаѓа до зголемено преминување на леукоцити од крвта во луменот на алвеолите (Dohoo & Meek, 1982).

Секое зголемување на бројот на соматски клетки над 250 000 и 300 000 се смета како показател на маститис. Леукоцитите се главната клеточна популација при рано воспаление и тие играат заштитна улога во однос на инфективните заболувања во млечната жлезда (Kherli & Shuster, 1994; Persson-Waller et al., 1997).

Во млечните жлезди на добитокот, инфицирани со патогени кои предизвикуваат маститис, соматските клетки од млекото се состојат во повеќе од 95% од полиморфонуклеарни леукоцити, а полиморфонуклеарните леукоцити се показатели за инфламаторен одговор. Било утврдено дека експерименталната интрамамарна инфекција на овците со *Staphylococcus aureus* или *Escherichia coli* предизвикала значително зголемување на леукоцитите во рок од 24 часа од инфекцијата (Detilleux et al., 1997).

Во проучувањето на патологијата на млечната жлезда и дијагностиката на инфекцијата кај вимето се користи бројот на соматски клетки (БСК) во млекото. Бројот на соматските клетки е во корелација со промените на физичките и хемиските особини на млекото, па затоа овој параметар се користи како индикатор за квалитет на суровото млеко и се смета за најдобар показател за здравствената состојба на млечната жлезда. Здравото виме многу малку влијае или воопшто не влијае на вкупниот број на бактерии во збирното млеко, додека кај кравите со маститис се јавува опасност од ширење на голем број на микроорганизми во млекото (Persson-Waller et al., 1997).

Зоран Арсевски

2.2.1. Маститис

Маститисот е мултиетиолошка и комплексна болест, која е дефинирана како воспаление на млечните жлезди. Се карактеризира со физички, хемиски и бактериолошки промени во млекото и патолошки промени во ткивата на жлездата (Radostis et al., 2000). Појавата на болеста е резултат на интеракција помеѓу трите главни фактори: инфективни агенси, отпорност на домаќинот и животната средина (Gera & Guha, 2011)

Маститисот е глобален проблем, бидејќи негативно влијае врз здравјето на животните, квалитетот на млекото и производството на млеко во секоја земја, вклучувајќи ги и развиените земји и предизвикува големи финансиски загуби (Sharma, Maiti & Sharma, 2007). Постои согласност меѓу авторите дека маститисот е најраспространетата заразна болест кај млечните говеда и од економски аспект е најштетна (Tiwari et al., 2010; Sharma et al., 2012; Elango et al., 2010; Halasa et al., 2007; Mostert et al., 2004).

Клиничкиот и супклиничкиот маститис се двете главни форми на болеста. Клиничкиот маститис резултира со промени во составот и изгледот на млекото, намаленото производство на млеко и присуството на сериозни знаци на инфламација (болка, оток и црвенило, со или без температура, вимето е воспалено кај инфицираните животни, се појавуваат грутчиња и партали во млекото). Спротивно на тоа, откривањето на супклиничкиот маститис на вимето е потешко, поради недостаток на видливи симптоми на болеста (Kivaria et al., 2006).

Супклиничката форма е за 15 до 40 пати поприсутна од клиничката форма, обично ѝ претходи на клиничката форма и е долготрајна (Seegers, Fourichon & Beaudeau, 2003). Важно е да се нагласи дека супклинички погодените животни остануваат континуиран извор на инфекција кај стадата (Islam et al., 2011). Постојат различни нивоа за откривање на маститис: индивидуално ниво на крави

Зоран Арсевски

во стадото и редовно тестирање на млекото (Kivaria et al., 2006). Во однос на индивидуалното ниво на кравите, супклиничка форма на болеста може да се открие со бактериолошки преглед и според бројот на соматските клетки (Muhammad et al., 2010).

Броењето на соматски клетки е прифатен како најдобар индекс што треба да се користи за да се предвиди инфекција на вимето кај кравите и е широко користен како показател од 60-тите години на минатиот век (Pyorala et al., 2003; Kivaria et al., 2006). При теренски услови, определувањето на соматски клетки во млекото обично се прави со помош на Калифорнија маститис тест (CMT). На тој начин резултатите добиени од Калифорнија маститис тестот се директно поврзани со просечниот број на соматски клетки од секоја четвртина на вимето (Radostis et al., 2000; Pyorala et al., 2003). Калифорнија маститис тестот има предност бидејќи е многу евтин. Во исто време, кога бројот на заразени крави во стадото е висок, бројот на соматските клетки на млеко може да биде покачен. Маститисот е комплексна болест и затоа не постои едноставно решение за нејзиното контролирање, па разбирањето на нејзиното појавување, поврзаните фактори на ризик и вклучените маститогени патогени се основни елементи во развојот на контролната програма (Kivaria et al., 2006).

2.2.2. Контролни програми за маститис

При појава на маститис постојат многу фактори кои дејствуваат истовремено, а болеста обично вклучува интеракција помеѓу практиката на управување и инфективните агенсии. Свесни дека особено супклиничкиот маститис е високо распространет меѓу стадата во земјите во развој, важно е да се идентификуваат факторите на ризик и да се процени нивниот придонес за

Зоран Арсевски

појавата на болеста. Идентификувањето на факторите на ризик е специфично за одредени области или за одредени фарми. Поради тоа, важно е спроведувањето на контролните програми за маститис кај кравите во однос на подолунавдените фактори (Almaw, Molla & Melaku, 2012)

- **Лична хигиена**

Молзачот пред молзењето секогаш треба да носи чиста облека и добро да ги измие рацете. Особено треба да се обрне внимание на ноктите, кои треба да се потсечени и чисти зашто може да го повредат вимето. Секоја мала гребнатица или повреда на вимето претставува потенцијална опасност за предизвикување на воспаление. Во случај кога молзачот има исеченици или ранички на рацете, повредите треба да се покриени со водоотпорен фластер. При рачно молзење, рацете по никоја цена не смеат да се потопуваат во млекото, зашто на овој начин се внесуваат сите микроорганизми од рацете и од под ноктите во млекото.

- **Правилна подготовка на кравата за молзење подразбира:**

- миење на вимето и боските;
- бришење и сушење на вимето и боските;
- користење на еднократни марамчиња за дезинфекција;
- масажа и преглед на вимето;
- дезинфекција на боските пред молзење со средство, при што се намалува ризикот од нови инфекции за 70 %;

Зоран Арсевски



Слика 1. Дезинфекција со средство пред молзење

Figure 1. Before milking disinfection with an agent

- измолзување на првите млазеви на млеко и нивно фрлање надвор од објектот;
- контрола на млекото на врна подлога;
- маститис-тест еднаш неделно за утврдување на бројот на соматски клетки.



Слика 2. Маститис-тест

Figure 2. Mastitis test

Зоран Арсевски

- **Молзење**

Молзењето може да се врши рачно или машински, а во зависност од начинот на одгледување на животните (врзани или слободни), молзењето може да се врши во самите лежишта или во молзилиште.



Слика 3. Рачно молзење

Figure 3. Manual milking



Слика 4. Машинско молзње

Figure 4. Machine Milking

Измолзеното млеко во канти или со млековод се изнесува надвор од шталата во посебна просторија (прирачна млекара). Најдобро е молзењето да се

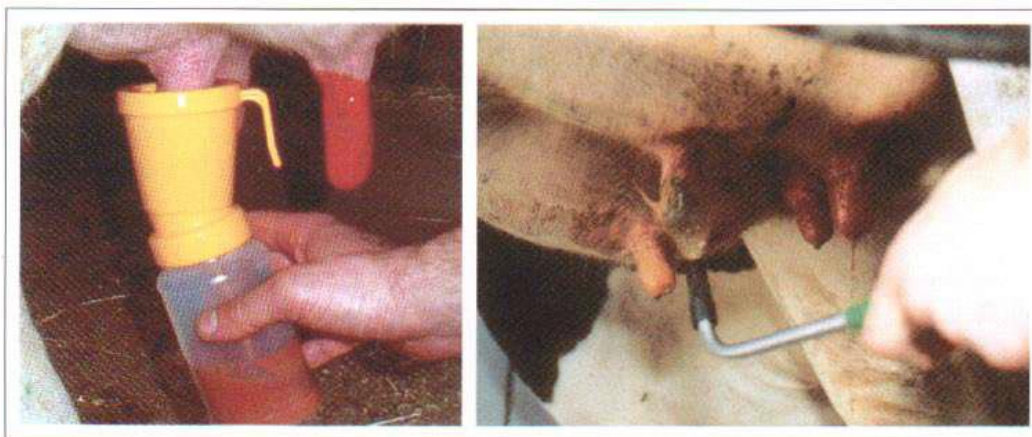
Зоран Арсевски

врши во молзилишта чија големина зависи од бројот на кравите. Понатаму, важно е и правилно и пријателско однесување со кравата пред и за време на молзењето. За време на молзењето во шталата мора да се одржува ред и мир. Молзењето треба да се прави пред или после хранењето на кравите.

Во текот на молзењето, шталата треба да биде чиста. При машинско молзење мораме да имаме исправен систем за молзење (правилен вакуум и пулсации), кој мора да биде темелно измиен и дезинфициран. Доколку молзењето се врши во молзилиште, истото веднаш по молзењето треба добро да се измие и дезинфицира.

- **Дезинфекција на боските после молзење**

Прстенестите мускули на крајот на боската го затвораат каналот за 15 минути после молзењето, кое се смета за критично време за контаминација со микроорганизми и појава на маститис, па затоа по молзењето боските треба веднаш да се дезинфицираат со средство кое дава заштита од 6 до 8 часа.



Слика 5. Дезинфекција на виме

Figure 5. Udder disinfectant

Зоран Арсевски

Влага, кал и ѓубриво, присутни во околината на животните, се извори на патогени и предизвикуваат маститис. Хигиената ги намалува патогените организми и ги спречува да живеат во непосредна средина или на кожата на животните и го минимизираат нивното ширење за време на процесот на молзење. Околината на животните со валкани постелки или земја, инфициран прибор, лоша вентилација и висока влажност, се важни фактори на ризик. Преваленцата на маститис се зголемува кај стадата сместени во лоши и дренажни услови, и во стада каде кравите болни од маститис не се молзат.

Појавата на маститис зависи од сезона до сезона, бидејќи растот и размножувањето на организмите се одвиваат на одредена температура и влажност. Неправилната вентилација со висока температура и релативна влажност го поттикнува размножувањето на разни бактерии. Изложување на животните на висока температура може да го зголеми стресот на животните и да го поремети нивниот имунитет (Sudan & Sharma, 2010).

2.2.3. Главни предизвикувачи на зарази и патогени

Маститисот е предизвикан од неколку видови на заеднички бактерии, габи, микоплазми и алги (Batavani, Asri & Naebzadeh, 2007). Маститисот најчесто е од бактериско потекло, со само неколку видови на бактерии. Патогените мастити се категоризирани како заразни или еколошки (Kivaria et al., 2006).

Заразните патогени живеат и се размножуваат на и во млечната жлезда на кравата и се шират од крава до крава, првенствено при молзење. Заразните патогени микроорганизми вклучуваат: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.* и *Corynebacterium bovis* (Radostis et al., 2000).

Еколошкиот маститис со интрамамарни инфекции (IMI) е предизвикан од патогени, чиј основен причинител е средината во која кравата живее (Smith,

Зоран Арсевски

Todhunter & Schoenberger, 1985). Најчесто изолираните еколошки патогени микроорганизми се стрептококите, освен *S. agalactiae*, вообичаено се нарекуваат еколошки стрептококи (*S. uberis* и *S. dysgalactiae*) и грам-негативни бактерии, како што се: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.* (Hogan et al., 1999). Бидејќи маститисот е комплексна болест која вклучува различни фактори, идентификувањето на главните патогени и фактори на ризик на ниво на стадо е од фундаментално значење за развој на соодветни превентивни и контролни мерки. (Hegdeet et al., 2013). Фреквенцијата на изолација на колиформи (*E. coli*, *Enterococcus faecalis*, итн.) и други микроорганизми кои предизвикуваат еколошки маститис обично се директно под влијание на нехигиенските услови во кои се сместени животните (Mekonnen & Tesafaye, 2010).

Во нашата земја, во лабораторијата за контрола на млекото при Факултетот за ветеринарна медицина Скопје, во рамките на своите активности во периодот февруари-август 2008 година, изработена е студија за добивање на прелиминарни резултати за состојбата на суровото млеко кое се произведува во Р. Македонија, во однос на бројот на соматските клетки во млекото (БСК) и бројот на бактерии (ВББ). Во студијата беа извршени 2065 анализи на ВББ и 1625 анализи на БСК од производители на млеко од различни региони на државата. Од испитаните примероци, само 41.8 % ги исполниле критериумите за БСК, а 41,45 критериумите за ВББ, дадени во Правилникот за 2008 година, додека само 10.7% од примероците одговараа на критериумите на Европската легислатива (Angelovski et al., 2008).

2.2.4. Влијание на маститисот врз составот и квалитетот на млекото

Млекото и млечните производи имаат потенцијал да пренесат патогени на луѓето. Присуството на патогени што се пренесуваат преку храна со млеко се

Зоран Арсевски

должи на директен контакт со контаминирани извори во животната средина на млечната фарма или на излучување од вимето на заразено животно. Сите хранливи состојки кои го прават млекото и млечните производи важен дел од човечката исхрана, исто така, го поддржуваат растот на патогените организми (Oliver, Jayarao & Almeida, 2005). Кога млекото на крави со супклинички маститис (без видливи промени) се меша со збирното млеко, тоа влегува во синџирот на исхрана и може да биде опасно за луѓето (Hameed, Sender & Korwin-Kossakowska, 2007)

Маститисот не само што влијае негативно на производството на млеко, како што беше дискутирано погоре, туку има и негативно влијание врз составот на млекото и неговите физичко-хемиски карактеристики. Овие промени се припишуваат на промените во васкуларната пермеабилност поради воспалителниот процес и оштетувањето на епителните клетки кои се одговорни за синтеза на млечни компоненти, како и промени во ензимското дејство на соматски клетки или микроорганизми во заразената млечна жлезда (Kitchen et al., 1981). Bansal (2005) утврдил дека содржината на лактоза е повисока во здравите четвртини, отколку во четвртини со висок број на соматски клетки. Минералите Na^+ и Cl^- се зголемуваат во маститското млеко, додека K^+ во млекото опаѓа. Бидејќи најголемиот дел од калциумот во млекото е поврзан со казеин, нарушувањето на синтезата на казеин придонесува за намалено количество на калциум во млекото (Jones et al., 2006).

Овие промени влијаат врз квалитетот на млекото, директно преку промени во техничкиот и хигиенскиот квалитет на млекото, што резултира со помалку ефикасна обработка на млекото (Hogeveen et al., 2005).

Пастеризацијата го намалува бројот на одржливи микроорганизми, но често не ги уништува токсините произведени од бактериски патогени. Оттука и кога се консумира сурово млеко или кога пастеризацијата е погрешна, преносот на

Зоран Арсевски

термофилните токсини произведени од патогени кои предизвикуваат маститис во млекото е уште еден проблем при производство на млеко (Hogan et al., 2005).

Патоген кој често се среќава во млекото и се јавува како чест причинител на маститис кај млечните крави широм светот е *Staphylococcus aureus*. Млечната жлезда од говедата може да биде значаен резервоар на ентеротоксигенични соеви на *S. aureus*. Ентеротоксини произведени од ентеротоксигенични соеви на *S. aureus* често се причина во случаи на труење со храна (Hogan et al., 2005). Оваа бактерија е еден од најкомплицираните патогени кои предизвикуваат маститис кај повеќето клинички студии. Последно, но не и најмалку важно, остатоците од антибиотици можат да доведат до сериозни реакции кај луѓето кои се алергични на антибиотици (Hameed, Sender & Kossakowska. 2007).

2.2.5. Економски ефекти на маститис

Научно е докажано дека маститисот предизвикува промени кои влијаат на квалитетот на млекото, директно преку промени во техничкиот и хигиенскиот квалитет на млекото. Тоа резултира со помалку ефикасна обработка на млекото, што би можело да резултира со помалку поволни технолошки својства. Кога маститското млеко се користи за производство, вообичаените дефекти на производот вклучуваат зголемена коагулација и намалени приноси на сирење, продолжено време за добивање на путер, изменета топлинска стабилност на прашоците, намален рок на траење и лоши органолептички својства на многу производи (Auldist et al., 2011).

Зоран Арсевски

2.3. Афлатоксинот М1 во сурово млеко

Афлатоксините се продуцирани претежно од два вида на филаментозни габи, *Aspegillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Неодамнешните студии покажаа дека некои *A.nominus* и *A.tamarii* видови исто така се способни за продуцирање на афлатоксини, од кои *A. nominus* е фенотипски сличен на *A. flavus* (Kurtzman et al., 1987; Goto et al., 1997). Ito и неговите соработници во 2001 година изолирале уште еден вид, *A. pseudotamarii*, кој исто така може да произведува афлатоксин. Овие габи припаѓаат на класата *Hyphomycetes*, и се подвид на *Deuteromycotina* од фамилијата на *Aspergillaceae*. Можат да контаминираат широк спектар на храна и земјоделски производи. Габите *Aspergillus* се способни за репродуцирање и колонизација на вариетети од супстрати, како и под вариетет на услови во локалната животна средина. Затоа, најголемиот дел од храната е подложна на афлатоксични габи во одредена фаза од продукцијата, процесирањето, транспортот или складирањето. Епидемијата на афлатоксикоза (позната како турска „Х“ болест) во 1960 година во Англија била причина за смртта на голем број домашни животни (Blount et al., 1961). Таа довела до откривање на афлатоксините во храна од кикиритки, кои биле истовремено контаминирани со *A. flavus* (Heseltine et al., 1979). Но, после угинувањето на 100. 000 мисирки во Англија (Turkey disease X) во 1960 година, од брашното од кикирики, кое било причина на угинувањето, изолирана е мувлата *Aspergillus flavus* како кристална супстанција, со сина флуоресценција. Тогаш овој токсин го добил и името:

A (*Aspergillus*) + ФЛА (*flavus*) + ТОКСИН = АФЛАТОКСИН (Blount 1961)

Следствено на тоа, афлатоксините биле откриени и во друга храна, посебно во пченката и оброците кои содржат влакнести семиња, (Chakrabarty et al., 1981; Sharma et al., 1994). Афлатоксинот М1 (AFM1) во млекото и млечните

Зоран Арсеvски

производи претставува значаен хигиенски ризик по човековото здравје. Резистентни на афлатоксин се: сојата, пченицата, овесот и јачменот.



Слика 6. Пченка заразена со афлатоксин (*Aspergillus flavus*)

Figure 6. Corn infected with aflatoxin (*Aspergillus flavus*)

Цицачите кои консумираат афлатоксин Б1 контаминирана храна, го елиминираат во млекото главниот 4-хидроксилен метаболит, познат како „млечен токсин“ или афлатоксин М1. Економските загуби припишани на афлатоксините се рефлектирани директно преку намалување на житните реколти, домашни животни и млечни производи, додека индиректните последици се: зголемени трошоци за програми за контрола на квалитетот, истражување и едукација, помал обем на размена со надворешни партнери, како и добивка и зголемен обем на трошоци за складирање и пакување на ранливите комодитети. Потенцијалните ризици од афлатоксините за човековото здравје доведоа до светска мониторинг програма за контрола на токсинот, како и регулаторни постапки од страна на скоро сите држави. Афлатоксичните соединенија се термостабилни и пастеризирани и не можат да бидат уништени, поради тоа тие се појавуваат во стерилизираното

Зоран Арсевски

млеко, како и кај ферментираните млечни производи. (Iha et al., 2013). Кон крајот од 2012 и почетокот на 2013 година, следејќи ја Европската комисија на системот за брзо предупредување за храна и добиточна храна (ЕС, 2013), ризикот за микотоксично загадување на добиточна храна и млеко беше изведен пред јавноста на Балканот и централно-европските земји. За време на периодот, којшто е претходно споменат, беа пријавени 10 предупредувања за присуство на зголемено ниво AFB₁. Беа детектирани концентрации на AFB₁, помеѓу 22.4 и 204 µg/kg, односно повисоко ниво отколку што било поставено од страна на MRL, од 20 µg/kg (ЕС, 2006b).

Последователно на овие предупредувања и имајќи го предвид фактот дека Македонија е вклучена во увезување на добиточна храна, најмногу од пределот на Југоисточна Европа, се зголеми и загриженоста која водеше до поставување на мерки за афлатоксична контрола на примероците од суровото млеко и добиточната храна. По многубројни истражувања во врска со можните канцерогени, тератогени, генотоксични и имуносупресивни влијанија, IARC го класифицираше AFM₁, заедно со други афлатоксини, како Група 1 канцероген (IARC, 1993).

Луѓето се изложени на AFM₁ преку ендогени продуцирања или преку внесување на млечни производи. Најизложени се доенчињата и малите деца, но, не може да се негира токсичното лачење на млекото и кај доилките (Turconi et al., 2004).

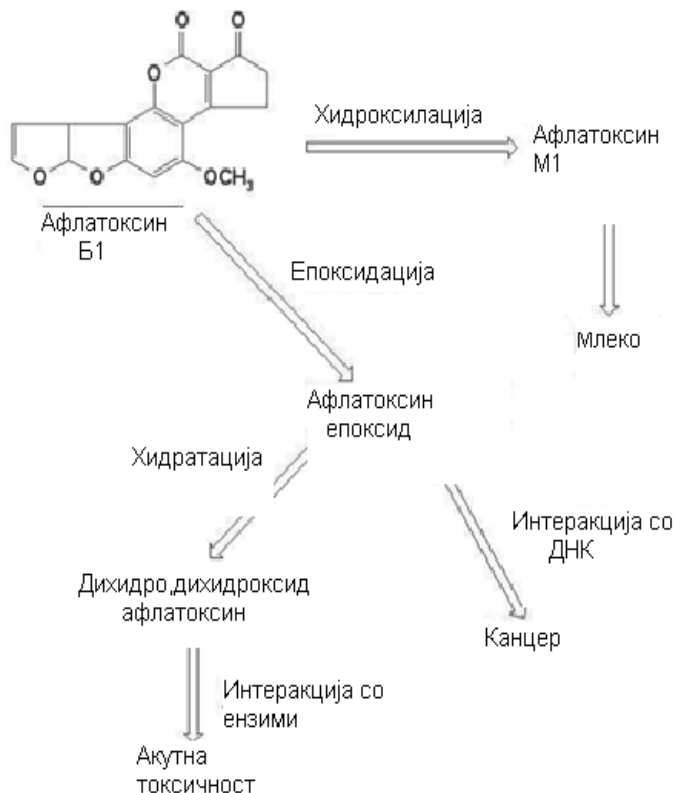
Зоран Арсевски

2.3.1. Формирање, токсичност, и регулација на афлатоксинот М1

Афлатоксинот Б1 (AFB1) се метаболизира од системот на хепатална микрозомална мешано-функциска оксидаза, но исто така може да предизвика и неколку други метаболички конверзии, во зависност од видот (Marsi et al, 1974).

Количината на афлатоксин М1 (AFM1) која се излучува во млекото, како процент од вкупниот AFB1 со средна вредност од 1 до 2%, варира од животно до животно, од ден на ден, како и од едно молзење до друго. AFM1 може да се детектира во млекото од 12 до 24 часа по првото консумирање, постигнувајќи го целосниот ефект по неколку денови. Кога внесувањето на AFB1 е завршено, концентracијата на AFM1 во млекото се намалува кон ниво кое не може да се детектира после 72 часа (Van Egmond et al., 1989). Battoccone со неговите соработници увидел дека постои линеарна врска помеѓу дозата и екскрецијата на AFM1 и AFB1 во овчото млеко (Battoccone et al., 2003).

Зоран Арсевски



Слика 7. Некои метаболитички производи од AFB1

Figure 7. Some metabolic products from AFB1

Интернационалната агенција за истражување на ракот (IARC, 1993) ги класифицира AFB1 и AFM1 соодветно како класа 1 и 2B (или како веројатни предизвикувачи) односно канцерогени.

Lafont воочил висока генотоксична активност на AFM1, иако таа била помала од таа на AFB1 (Lafont et al., 1989). Афлатоксините покажувале способност и за акутна и за хронична токсичност. Може да се забележи дека кај некои видови на животни, како на пример, кај глушецот, афлатоксините се со зголемена канцерогеност, додека пак кај некои други видови е потешко да се демонстрира истата канцерогеност. Постојат неколку метаболитички реакции, како

Зоран Арсевски

на пример, деметилацијата кон афлатоксин В1 и хидрација кон афлатоксин В2а, кои можат да доведат до намалување на токсичноста. Афлатоксините се еден од значајните етиолошки фактори кои придонесуваат за развој на Hepatocellular Carcinoma (IARC, 2002), додека пак во поново време се откриени и врски помеѓу изложеноста на афлатоксини за време на детството, како и слабеење на растот кај децата (Gong et al., 2004). Моменталните границите на AFM1 се високо варијабилни во зависност од степенот на развиеност и економскиот стандард на државата. Според Codex Alimentarius, максималното ниво на AFM1 во течното млеко во прав или процесирани млечни производи, не треба да ја надминуваат границата од 50 нанограми на килограм (Codex Alimentarius Commissions, 2001). Од друга страна пак, според регулативата на САД, нивото на AFM1 во млекото не треба да биде поголемо од 500 нанограми на килограм (Stoloff et al., 1991). Според тоа, постојат разлики во максимално дозволена граница на AFM1 во разни земји (Pohland & Yess, 1992). Сепак, Stoloff воочил дека мониторингот и превентивните програми засега се најефективните стратегии кои доведуваат до намалување на ризикот од изложеност кај луѓето и кај животните и тие се:

- Евалуација на нивото на човековата изложеност, и здравствените ризици базирани врз токсиколошките истражувања спроведени на животни;
- Тешкотии при проценката на консумацијата и исхраната; и
- Деконтаминација и отстранување на микотоксините од човековата и животинската исхрана (Stoloff et al., 1991).

Зоран Арсевски

2.3.2. Извор на афлатоксини во земјоделски производи

Контаминацијата на земјоделските производи со афлатоксин настанува поради раст на габични супстрати кои овозможуваат производство на афлатоксични мувли. Природната контаминација на житни култури, смокви, маслодајни растенија, ореви, тутун, и долг список на други стоки, е заедничка појава (Detroy et al., 1971).

Способноста да се создадат афлатоксини генетски е многу променлива. Понекогаш контаминацијата со афлатоксин настанува пред жетвата и обично е поврзана со температурните разлики и појава на т.н суша стрес (Klich et al., 1987).

Уште попроблематична е судбината на културите складирани под услови кои овозможуваат појава на мувла. При складирањето, важни променливи се: содржина на влага во просторијата за складирање и релативната влажност на околината (Diener et al., 2001).



Слика 8. Фактори кои влијаат на појавата на микотоксините во синџирот на исхрана

Figure 8. Factors which affect mycotoxins occurrence in the food chain

Зоран Арсевски

2.3.3. Продукција на афлатоксин

Афлатоксините можат да бидат произведени од страна на три видови на *Aspergillus* габи: *A. flavus*, *A. parasiticus* и ретки *A. nomius*, кои ги контаминираат растенијата и растителните производи. *A. flavus* и *A. parasiticus* се најприсутни габи, покажувајќи посебен афинитет за семиња со висок процент на растително масло. *A. flavus* и *A. parasiticus* колонизираат растенија од тропска или суптропска клима, но тие, исто така, може да колонизираат производи во постбербен период доколку не се соодветно дехидрирани, т.е сушени (Whitlow & Hagler, 2002). Спектарот на раст на овие габи изнесува од 12 до 48°C, или на 36-38°C. Создавање на афлатоксин се случува на температури помеѓу 20 и 30°C (Battilani et al., 2004).

Главни извори на афлатоксини во храната се: кикирики, пченка и памук. Овие габи можат да преживеат во почвата, во стрништата, и кога условите се погодни тие почнуваат да произведуваат спори кои се шират преку ветер (Battilani et al., 2004). *A. Parasiticus* ја претпочита почвата како своја животната средина, а сè почесто се наоѓа и на ореви, додека *A. flavus* е прилагодена на воздушна средина и доминира кај видови на суво овошје, памук и пченка. *A. flavus* е габа типична за пченката и генерално ги колонизира оштетените зрна на пченката, во некои случаи може да произведе ензими *пектиназа* и *кутиназа*, кои овозможуваат да навлезе во зрната или преку свилата од класот (Battilani et al., 2004).

Производството на афлатоксин е во силна корелација со влагата на зрната, еколошките услови, особено високи температури и суша. Начинот на режењето, исто така, може да игра важна улога во создавањето на афлатоксин. Одгледување на монокултура и садење на хибриди, несоодветни за областа на одгледување и ниска отпорност на удар од инсекти, се поволни фактори за

Зоран Арсевски

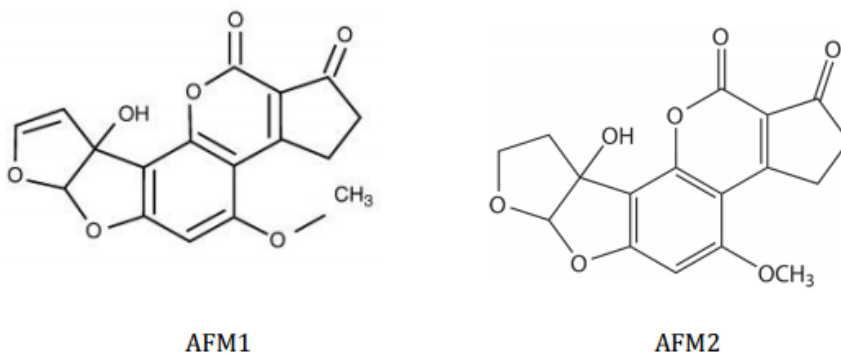
создавање на афлатоксин. Сите фактори како сушата, сеењето со несоодветна густина и тајминг, песоклива почва, неадекватна контрола на штетници и прекумерно ѓубрење со азотни ѓубрива, доведуваат да се зголеми акумулацијата на афлатоксин. Нивото на контаминација е кумулативно, па затоа бербата, времето и условите на сушење може да играат подеднакво важна улога во акумулацијата на афлатоксин (Battilani et al., 2004).

2.3.4. Физички и хемиски својства на афлатоксини

Афлатоксините се токсични, канцерогени, мутагени, и имуносупресивни производи, како секундарни метаболити создадени од страна на габа *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* на различни прехранбени производи (Ozay et al., 2008). Афлатоксинот B1 (AFB1) обично преовладува на растенијата, како и во прехранбените производи. AFB1 има бледа кристално-жота боја и е без мирис (Guzman et al., 2007). Афлатоксините се растворливи во етанол, хлороформ, ацетон и ацетонитрил. *Aspergillus parasiticus* ги создава AFG1 и AFG2 како и AFB1 и AFB2.

Четири други афлатоксини M1, M2, B2A, G2A, кои може да се добијат во мала количина, се изолирани од културата од *A. flavus* и *A. parasiticus* (Ghorbanian et al., 2008). Афлатоксините M1 и M2 се главни метаболити на AFB1 и AFB2, и се наоѓаат во млеко од животни кои консумирале храна контаминирана со афлатоксин (Reddy & Waliyar, 2008).

Зоран Арсевски



Слика 9. Структурни формули на афлатоксините M1 и M2

Figure 9. Structural formula on aflatoxin M1 and M2

2.3.5. AFM1 во млекото

Млекото, како течност, е високо варијабилен продукт, кој рапидно може да го изгуби својот квалитет и да се расипе доколку не е одржуван правилно. Бидејќи млекото може да се произведе на различни начини, складирањето и процесирањето се од голема важност. Kiermier и Meshaley во 1977 год. ги проучувале ефектите од ладните третмани и воочиле дека AFM1-токсините се намалиле од 11 до 25% после првите 3 дена на температура од 5°C, 40% на 0°C, и 80% после 6 дена. McKinney во 1973 год. открил дека доколку млекото се замрзне на -18°C во период од 30 дена, процентот на токсинот се намалува до 14%, а по 53 дена дури и до 85%. Stollef сугестирал помала деградација на AFM1 на -18 °C, со незначителна загуба после 53-тиот ден. Но, кога станува збор за ефектите од затоплувањето, добиени се сосема контрадикторни извештаи. Choudhary во 1998 год. ги проучувал ефектите од различните третмани со затоплувања на токсинот AFM1 во кравјото млеко, и заклучил дека при стерилизацијата на млекото на 121°C во период од 15 минути, се предизвикува намалување на AFM1 за 12.21%, додека вриењето го намалило AFM1 за 14.50%. Според тоа, истражувачите

Зоран Арсевски

заклучиле дека уништувањето на AFM1 со топлински третман зависи од комбинацијата на температура и временскиот период. Bakirci во 2001 год. открил дека со пастеризацијата се предизвикува намалување на нивото на AFM1 со стапка од 7.62%. Други истражувачи потврдиле дека пастеризацијата може парцијално да ја намали количината на AFM1 во млекото (Deveci et al., 2007). Но, некои други извештаи упатуваат дека афлатоксините се стабилни за време на третмани со топлина, како на пример, пастеризација и стерилизација (Van-Egmond et al. 1977; Wiseman and Marth, 1983; Yousef and Marth, 1989; Govaris et al. 2001).

Дистрибуцијата на AFM1 во млекото не е хомогена. Отстранувањето на кајмакот може да влијае на дистрибуцијата на AFM1, бидејќи 80% од AFM1 се наоѓа во делот на безмасното млеко, што значи дека AFM1 се врзува за казеинот (Brackett, 1998/2a). Според Van Egmond and Paulsch во 1986 год. однесувањето на AFM1 во процеси кои инволвираат отстранување на маснотии, може да биде образложено со неговите полуполарни својства. Контрадикторни индикации се добиени во однос на влијанието на млечната концентрација врз AFM1. Kiermeier во 1973 година поднел извештај без загуби на AFM1, додека пак некои автори опсервирале загуби на AFM1, варирајќи од 60% до 75% (Moreau et al., 1976; Purchase et al., 1973). Многу автори, исто така, имаат покажано дека промената на сезоните може да влијае на концентрацијата на афлатоксинот M1. Истите автори поднеле извештај за зголемена концентрација на AFM1 за време на ладната сезона, споредбено за време на топлите сезони (Applebaum et al., 1982; Blanco et al., 1988b; Hussain & Anwar, 2008; Tajkarimi et al. 2008; Fallah et al., 2010; Bilandzic et al., 2010). Во зимските периоди најголемиот дел од молзните животни се прехрануваат со сточната храна, а тоа доведува до зголемена концентрација на афлатоксин B1, кој пак ја зголемува концентрацијата на AFM1 во млекото.

Зоран Арсевски

Покрај тоа, и температурите и влагата исто така придонесуваат за зголемена концентрација на афлатоксинот В1 во сточната исхрана. *A. flavus* и *A. Parasiticus* можат многу лесно да се формираат во сточна храна, каде што имаат влажност помеѓу 13% и 18%, како и влажност на околината помеѓу 50% и 60% (Jay et al., 1992). Уште една причина за ниските нивоа на AFM1 за време на летниот период се пасиштата.

Денес зголемената ефикасност на имуноензимната екстракција и прецизноста на аналитичката методологија и опрема, како на пример, високоефикасна течна хроматографија со флуоросцентен детектор, придонесуваат детектираните лимити да се намалуваат (Galvano et al., 1996).

2.3.6. Ефект на преработка на млеко врз содржината AFM1

- **Третман со висока температура**

Повеќето од студиите покажуваат дека третманите, како пастеризација и стерилизација, не предизвикуваат значително промени во износ од AFM1 во овие производи (Park et al., 2002)

- **Чување на ниска температура**

Според истражувањата, чувањето на замрзнато контаминирано млеко и други млечни производи за неколку месеци не влијаело на нивната содржина на AFM1 (JECFA, 2001).

Зоран Арсевски

- **Преработка на млечни производи**

Истражувањата покажале дека при преработка на млечни производи кои се произведени со загревање на млеко и додавање на стартер култура за да се иницира ферментација, како кефир и јогурт, не постои значително намалување на содржината на AFM1 во нивниот состав (Park et al., 2002).

- **Концентрација и сушење на млеко**

Дехидрирано, концентрирано или сушено млеко настанува со делумно или целосно отстранување на водата од млекото, со или без греење, што доведува до концентрирање на AFM1 (JECFA, 2001).

2.4 Техники за детекција

По екстракција на афлатоксинот од примерокот и аплицирањето на стерилна подлога следува идентификација и квантификација. За идентификација на афлатоксините се користат:

- биолошки,
- аналитички и
- имунолошки методи.

Биолошкиот метод се употребува во случаи кога аналитичкиот и имунолошкиот метод не се достапни за рутинска анализа. Но, биолошките анализи се квалитативни и бараат повеќе време за анализа и затоа се избегнуваат при рутинска контрола на млекото.

Во поново време, развиени се и повеќе хроматографски методи, кои се употребуваат за контрола на квалитетот на млекото и тоа: тенкослојна

Зоран Арсевски

хроматографија, тенкослојна хроматографија со високи перформанси и течна хроматографија со високи перформанси (HPLC).

- **Тенкослојна хроматографија (Thin-layer chromatography TLC)**

Тенкослојна хроматографија е техника која се употребува за раздвојување, проценка на чистотата и идентификацијата на афлатоксините. Со помош на TLC-методот може да се идентификуваат и квантифицираат нивоа на афлатоксини почнувајќи од 1 ng/g. TLC се состои од стационарна фаза имобилизирана на стакло и растворувач кој има улога на мобилна фаза. Тенкослојната хроматографија е стандардниот AOAC-метод за анализа на афлатоксини уште од 1971 година (AOAC Official Method 974.17 1990). Во научната студија спроведена од Van Egmond и неговите соработници во 1978 год. е потврдена идентификација на афлатоксинот M1 преку реакција на афлатоксинот со трифлуорооцетна киселина (TFA). Rf-вредноста на синиот флуоросцентен дериват била споредена со стандардниот референтен систем за афлатоксин M1.

- **Тенкослојна хроматографија со високи перформанси (HP-TLC)**

Тенкослојна хроматографија со високи перформанси (HPTLC) е подобрена форма на тенкослојната хроматографија (TLC). HPTLC ги надминува проблемите поврзани со конвенционалните техники на TLC, преку автоматизација на апликацијата, развојот и примената на примероците. Не е изненадувачки што во моментот HPTLC е една од најефикасните и најпрецизни методи за анализа на афлатоксини. Сепак, условот за квалификувани оператори, трошоците за опремата и опсежната претходна обработка на примерокот, ја ограничуваат HPTLC за работа во лабораторија и затоа не се применува на терен (Ramesh, Sarathchandra & Sureshkumar, 1992).

Зоран Арсевски



Слика 10. ХП ТЛЦ-апарат

Figure 10. HP TLC aparat

- Течна хроматографија со високи перформанси (HPLC)

Течната хроматографија со високи перформанси е многу прецизна и високоавтоматизирана техника со висока селективност и сензитивност. HPLC-методите се развиени за детекција на сите позначајни микотоксини во житариците и во другите земојделски култури. Во однос на поларноста на стационарна и мобилна фаза, се разликуваат: хроматографија со нормална фаза и хроматографија со реверзна фаза. Во хроматографијата со нормална фаза се употребуваат: поларна стационарна фаза (пример, силиконски гел) и неполарен

Зоран Арсевски

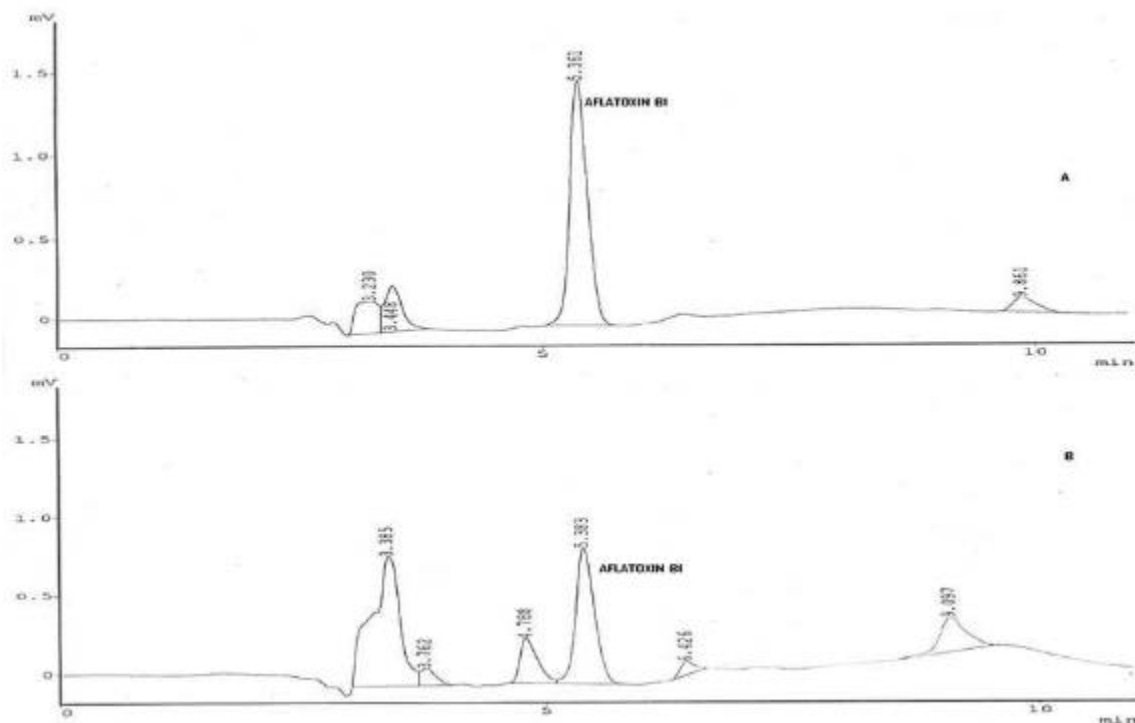
раствор (пример хексан). Хроматографијата со реверзна фаза (RP-HPLC) вклучува неполярна стационарна фаза (на пример: C-8 или C-18) и поларна мобилна фаза (на пример: вода, метанол или ацетонитрил). Со HPLC-методот за детекцијата најчесто се користи УВ (ултравиолетов) детектор или флуоросцентен детектор (FLD). Флуоросцентната детекција има супериорна сензитивност и таа најчесто се користи за детекција на афлатоксините. Реверзно-фазна RP-HPLC се користи вообичаено за детерминација на присуството на афлатоксини во храната. HPLC-системот дава резултати во форма на хроматограм. Хроматограмот дава квалитативен и квантитативен податок, односно дава информација за идентитетот на супстанцијата (преку ретенционо време), додека површината под пикот дава информација за количеството на компонентата во смесата.



Слика 11. HPLC-систем

Figure 11. HPLC system

Зоран Арсевски



Графикон 1: Примерок од HPLC-хроматограм, каде што A е стандардот, а Б е примерокот

Chart 1: A sample of the HPLC chromatogram, where A is the standard, and B is the sample

- Течна хроматографија со масена спектрометрија (HPLC-MS)

Течната хроматографија со масена спектрометрија (HPLC-MS) е релативно нова техника за детекцијата на афлатоксини и воедно е и една од најсовремените техники за идентификација и квантификација на афлатоксини. Со помош на масен детектор се врши раскинување на молекулата на афлатоксинот и фрагментите од молекулата се препознаваат преку споредување со масени спектри во базата на податоци што ја има секој инструмент.

Зоран Арсевски

2.4.1 Имунолошки методи

Имунолошките методи се базираат на афинитетите на моноклоналните или поликлоналните антитела на афлатоксините. Поради напредувањата остварени на полето на биотехнологијата, високопрецизни антитела базирани тестови се сега комерцијално достапни за мерење на афлатоксини во храната за помалку од 10 минути. Потребни се две главни побарувања за имунолошките методи. Првото побарување се состои од антитела со висок квалитет, додека вториот е методологијата за употреба на антителата за да се направи проценка на афлатоксините. Бидејќи молекулите на афлатоксините се со ниска молекуларна тежина, тие не можат да го стимулираат имунолошкиот систем да продуцира антитела. Овие молекули, кои се со ниска молекуларна тежина, кои не можат да го евоцираат имунолошкиот систем, се нарекуваат хаптени. Затоа, пред имунизацијата, афлатоксините мора да бидат конјугирани во молекула-носач, која е со големина на ниво на протеин. *Bovine serum albumin* (BSA) е најчесто употребуван како протеин-носач и хаптенот конјугира со него. Трите типа на имунохемиски методи се: имуноафинитетна линиска анализа (ICA), радиоимуноесеј (RIA) и ензимски имуносорбент (ELISA). Имуноафинитетните линии се најчесто употребувани за намените за чистење, додека пак (RIA) има лимитирана улога во детекцијата на афлатоксини. Најчесто употребуван е ELISA за проценката на афлатоксини.

Многу брзи тестови, со употреба на специфични антитела за изолација и детекција на микотоксини во храната се дискутирани и аплицирани од страна на различни истражувачи (Newsome et al., 1987; Groopman & Donahue, 1988). Употребата на имуноафинитетни кертрици е напредок остварен во поново време во поглед на квантитативната екстракција на афлатоксини. Моноклоналните

Зоран Арсевски

антитела, кои се специфични за афлатоксините, се имобилизирани на Sepharose® кои понатаму се пакуваат во мали кертриџи.

Истражувачката работа на Mortimer и неговите соработници во 1987 година, била многу значајна, бидејќи таа е првиот публикуван метод за афлатоксинот M1 со имуноафинитетни линии. За детерминација на афлатоксинот, се употребува примерок од млеко кој е сместен во една од афинитетните линии. Антигенот, т.е афлатоксинот е селективно комплексиран од страна на специфичните антитела кои се наоѓаат на цврста основа, од која подоцна се развиваат антиген-антитело комплекс. Потоа, линијата (инструмент) се пречистува со вода за да се тргнат сите матични остатоци од примерокот. Мала количина на чист ацетонитрил се употребува да се отстрани афлатоксинот, кој подоцна се концентрира и анализира од HPLC придружуван со флуоросцентна детекција.

Досега има изведено многу колаборативни студии за да се развијат имунолошките методи; посебно за афлатоксинот M1. Имуноафинитетните базирани методи за афлатоксинот M1 беа модифицирани и последователно публикувани и студирани колаборативно под покровителство на Интернационалната млечна федерација и AOAC Интернационал, од страна на групи од најчесто европски лаборатории, кои можат да детерминираат афлатоксин M1 во млекото со концентрации еднакви на 0.05 µg/ литар. Студија на Tuinstra и неговите соработници во 1993 год. доведе до Стандардот 171 на Интернационалната млечна федерација.

Друга студија била спроведена со цел да се евалуира ефективностa на имуноафинитетната линија за чистење на течната хроматографија за детерминација на афлатоксин M1 во млекото со предложените Европски регулаторни лимити (Dragacci et al. 2001). Процедурата вклучува центрифугирање, филтрација и апликација на тест-партицијата во имуноафинитетната линија. Потоа, како и во претходно опишаниот дел, линијата

Зоран Арсевски

се измива со вода и афлатоксинот се елутира со чист ацетонитрил. Афлатоксинот се сепарира со реверзибилно-фазна течна хроматографија, додека пак детекцијата се врши со флуоросцентен детектор.

2.4.2 Ензимски имуносорбент (ELISA)

Ензимски имуносорбент е најшироко употребуваниот тест досега за откривање и детекција на афлатоксини, во најголема мера поради неговата едноставност, робусност и сензитивност. Постојат два типа на ензимски имуносорбенти, кои се директно компетативни, ензимски имуносорбенти и индиректни компетативни ензимски имуносорбенти. Во директно компетативниот ензимски имуносорбент методот, специфично антитело се обложува до цврста фаза во микротитер плоча, додека пак кај индиректниот компетативен ензимски имуносорбент метод токсин-протеин коњугатот е обложен врз микротитерната плоча. При анализите на афлатоксините, методот на директно компетативни ензимски имуносорбенти е секогаш употребуван. Воопшто методот на ензимски имуносорбент е детекција и квантификација на антигенот (афлатоксинот) во даден примерок, со употреба на ензимски лабелиран токсин и антитела кои се специфични за афлатоксините. Ензимскиот имуносорбент е базиран на антиген-антитело реакцијата (Aycicek et al., 2005). Антигенот е супстанција која може да започне продукција на антитела кога е внесен во топлокрвните животни. Додека на почетокот антителата се гликопротеини кои се продуцираат како резултат на имунолошки одговор, по додавањето на антителата, доаѓа до продукцијата на специфичен антиген-антитело комплекс. Во директно компетативниот ензимски имуносорбент, специфични антитела на афлатоксинот се обложуваат во отворите во микротитер лентата. Тест-примероците или референтниот афлатоксин се ставаат во отворите исто така. По инкубацијата и измивањето (коњугат од

Зоран Арсевски

афлатоксин и серум албумин за говеда, се додава на енсимската молекула како на пример: рен пероксидаза или пеницилиназа или алкална фосфатаза) ензимскиот коњугат се додава во отворите. Слободните афлатоксини и афлатоксинскиот ензимен коњугат се натпреваруваат за афлатоксинните антитела и нивните лежишта во отворите. Чекорите со измивање ги отстрануваат неповрзаните ензимски коњугати. Потоа се додава супстрат/хромоген во отворите и се инкубира. Ензимски поврзаниот коњугат го конвертира безбојниот хромоген во син продукт. Потоа се додава „стоп“ солуцијата, која доведува до промена на бојата од сина во жолта. Потоа се земаат мерки со помош на 450 нанометарска фотометрија во ELISA-апарат. Апсорпцијата е обратно пропорционална со концентрацијата на афлатоксин во примерокот, т.е колку помала апсорпција, толку е повисока концентрацијата на афлатоксинот. Главниот инструмент кој се употребува во имуносорбентните истражување е ELISA-инструментот. Во основа тоа е фотометричен инструмент, кој ги дава апсорбентите или солуцијата на крајот на дадениот процес. Во следната фотографија е прикажан ELISA-инструмент.

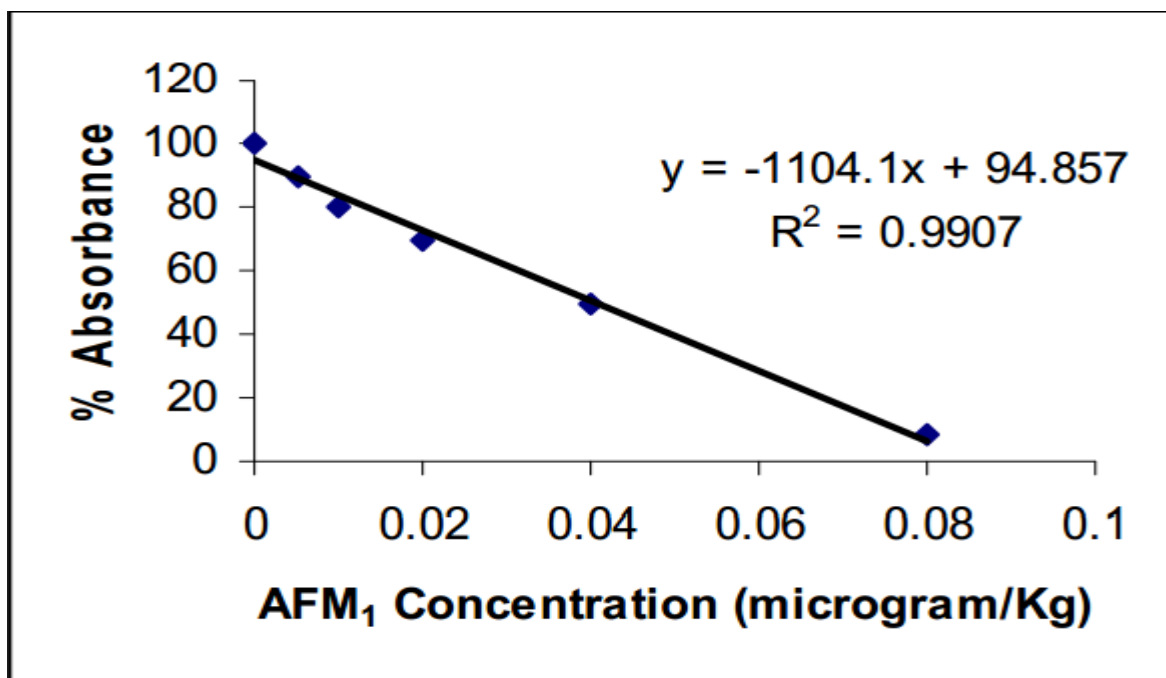


Слика 12. ELISA-инструмент

Figure 12. ELISA instrument

Зоран Арсевски

Примерок од ензимската имуносорбентна калибрациска крива е прикажана на следниот графикон. ELISA-инструментот дава исчитувања на апсорбентите, од каде пак понатаму се пресметува процентот на апсорпцијата. За стандардни раствори, процентот на апсорпцијата е поставен наспроти концентрацијата на афлатоксин за да се добие калибрациската крива. Концентрацијата на афлатоксинот е прикажана со x-кривата, додека пак апсорпцијата е прикажана на y-кривата. Од калибрациската крива се добива калкулацијата во примероците на концентрација на афлатоксини.



Слика 13. Примерок со калибрациона крива на анализа на имуносорбент поврзан со ензим.

Figure 13. A sample enzyme-linked immunosorbent assay calibration curve

Зоран Арсевски

3. Цел на Истражувањето

Во овој труд основна цел беше да се определи квалитетот на млекото произведено во Овчеполскиот Регион. Бидејќи сè почесто корелацијата на соматски клетки и вкупниот број на бактерии се показатели на исправно и квалитетно млеко, една од задачите беше да истажине колкав е бројот на соматските клетки како индикатор на болест на млечната жлезда или популарно наречен маститис и вкупниот број на бактерии во млекото.

Во периодот од 2013 до 2014 година во Република Македонија беше откриена зголемена концентрација на афлатоксин М1 и негово присуство како во увезеното млеко, така и во домашното производство. Агенцијата за храна и ветеринарство најави зачестени контроли за откривање на афлатоксинот М1. Бидејќи станува збор за канцерогена супстанција во храна, која е доминантна кај најранливата популација од населението (бебиња, деца и стари лица), во овој труд беа опфатени и анализи за присуство на афлатоксинот М1 во млекото од Овчеполскиот Регион.

По извршените анализи се направени и споредби со последните студии објавени во Република Македонија, а исто така е направена и споредба со ЕУ-регулативите.

4. Материјали и методи

4.1. Земање примероци

Во ова магистерска теза предмет на истражување за присуство на афлатоксин М1 беа 60 примероци на сурово млеко од Овчеполскиот Регион. Сите примероци беа чувани на температура од 2 до 8°C и беа тестирани за време од 24

Зоран Арсевски

часа. Некои примероци кои не бевме во можност да ги анализираме во рок од 24 часа, беа чувани на -20 °C.

За определување на вкупниот број на бактерии во периодот од јануари до јуни 2018 година, беа земени 1316 примероци, додека за определување на бројот на соматски клетки, 478 примероци на сурово млеко од производители од Овчеполскиот Регион. Примероците се земени и доставени во пластични стерилни и запечатени чаши со волумен од 50 мл, конзервирани од Adizol (Sigma-Aldrich vol. 25 мл.). Истите по земање се транспортирани на температура од 4°C во лабораторијата за испитување на квалитетот на сурово млеко при Факултетот за ветеринарна медицина - Скопје.

4.2. Анализа на вкупен број соматски клетки и број на бактерии

Сите примероци се анализирани со акредитиран метод, во согласност со ISO 21187:2004. За испитувањата се користеше инструмент Bactoscan 8000S (Foss Electric Denmark). Процедурата за БМО беше изведена според стандардот Milk-Quantitative determination of bacteriological quality, IDF Standard 161A: 1995.

Овој апарат работи на принцип на бојење на бактериите со флуоросцентна боја. Во постапката по бојењето на бактериите тенок филм од примерокот на млеко, нанаесен на ротирачки диск, поминува под објективот на флуоросцентен микроскоп. Овој микроскоп ги брои обоените бактерии како светлосни пулсирања кои се конвертираат по електронски пат и се прикажуваат како нумерички податоци.

Пред да се започне со броење на соматските клетки, примероците се загреваат на температура од 40°C и истите двапати се анализираат на апаратот Fossomatic 5000 (FossElectric, Denmark). Процедурата за броење на соматски

Зоран Арсевски

клетки е изведена во согласност со акредитиран метод ISO 17025-FVM-SOP-398, според референци од ISO 13366-2:2006.

4.3. Анализи на Афлатоксин М₁ кај сировото млеко со ELISA

Тестирањето со помош на ELISA-опремата Immunoscreen AFM₁ (Tecna, s.r.l, Trieste, Italy) беше овозможено врз основа на инструкциите на производителот. Сите стандард контроли и примероци беа двојно изведени на 96-well плоча, обложени со анти – AFM₁ антитела. По извршување на колоризацијата, со помош на соодветниот хромоген, примероците беа измерени, користејќи микроплатен фотометар Bio-Rad Model 680 (Philadelphia, USA) поставен на 450 nm. Измерената апсорпција беше обратнопропорционална на концентрацијата на AFM₁ во примерокот и измерениот опсег на апаратурата изнесување од 5 до 250 ng/kg.

Аналитичкиот квалитет на ELISA-методот беше утврден со додавање на сеопфатна методска валидација. Како што е предвидено во Decision 2002/657/EC (EC, 2002), беа проценети последователните валидациони параметри: половично – максимална инхибиторна концентрација (IC₅₀), детекција на ограничување (LOD), квантификационен лимит (LOQ), детектирање на способноста (CCβ), обновување и прецизност EN ISO 14675:2003 (ISO, 2003a). Понатаму резултатите од ELISA-методот беа споредени со резултатите од FAPAS-тестот.

4.4. Анализа на афлатоксин М₁ кај сировото млеко со HPLC-FD

Хроматографските анализи, со хроматографот Waters Alliance 2695, со мали модификации, всушност е ISO-методот за анализирање на AFM₁ во сирово млеко (ISO, 2007). За испитување е користена хроматографска колона со реверзна фаза (C18, 150 mm, 4.6 mm I.D., 5 μm честички), а раздвојувањето беше изведено

Зоран Арсевски

на собна температура. Применет е изократски мод со смеша од вода и ацетонитрил (75/25 v/v), со проток од 1 mL/min. По инјектирањето на 100 µL екстракт од примерокот во хроматографскиот систем, идентификацијата на AFM₁, беше изведено на 365 и 435 nm. Примероците од млекото беа прочистени, преку употреба на Aflarper M AF M₁ имуно-афимирани екстрактни колони на цврста фаза (R-Biopharm, Darmstadt, Germany), овозможувајќи концентрирање на токсинот и до 25 пати. Како референтен стандард, ние користевме AFM₁ матичен раствор во ацетонитрил, со концентрација од 0,5 µg/mL, обезбедени од страна на R-Biopharm (Darmstadt, Germany). Методот беше валидизиран, врз основа на барањата и критериумите, поставени од страна на Commission Regulation No. 406/2006/EC (EC, 2006a), последователно на пристапот (EC, 2002) на Комисиската одлука 202/657/EC. Како додаток, веродостојноста на методот беше спореден со резултатите добиени од FAPAS-тестот.

5. Резултати и дискусија

Во однос на последните истражувања во Република Македонија на Ангеловски и неговите соработници во 2008 година, за квалитетот на суровото млеко во однос на бројот на соматските клетки во млекото (БСК) и бројот на бактерии (ВББ), од испитаните примероци само 41.8% ги исполниле критериумите за БСК, а 41,45% критериумите за (ВББ), дадени во Правилникот за 2008 година, додека само 10.7% од примероците одговараа на критериумите на европската легислатива (Angelovski et al., 2008).

Истражувањето кое беше спроведено во овој магистерски труд е ограничено на еден регион (Овчеполскиот) во период од јануари до јуни 2018 година и истото се работеше според Правилник за изменување на правилникот за посебните барања за безбедност и хигиена и постапката на вршење на

Зоран Арсевски

службените контроли на млекото и млечните производи (Службен весник на РМ, бр. 197 од 28.10.2016 година).

Табела 1 Регулатива за присуство на соматски клетки и бактерии во сурово млеко

Table 1 Regulation of the presence of somatic cells and bacteria in raw milk

Година	Број на Микроорганизми	Број на соматски клетки
01.01. 2017	400.000	400.000
01.01. 2018	200.000	400.000
01.01. 2019	200.000	400.000
01.01. 2020	100.000	400.000

5.1. Вкупен број на бактерии (ВББ)

Од вкупно 1320 анализи кои се земени двапати месечно во прва и втора половина од месецот (анализа 1 - 667 примерока и анализа 2 - 653 примерока) само 138 примерока ги задоволуваат националните стандарди, додека според ЕУ (*Council Directive 92/46 EEC*) стандарди за квалитет на млеко, присуството на бактерии не го задоволува стандардот. Претставено по месеци, како средна вредност на бактерии кои биле детектирани во суровото млекото, видно е дека просечната вредност во месец јануари е најмала со 326069,44 cfu/ml, додека во мај е најголема со 623395,6 cfu/ml.

Зоран Арсевски

Табела 2 Вкупен број на бактерии со средна вредност по месеци

Table 2 Number of bacteria average value per month

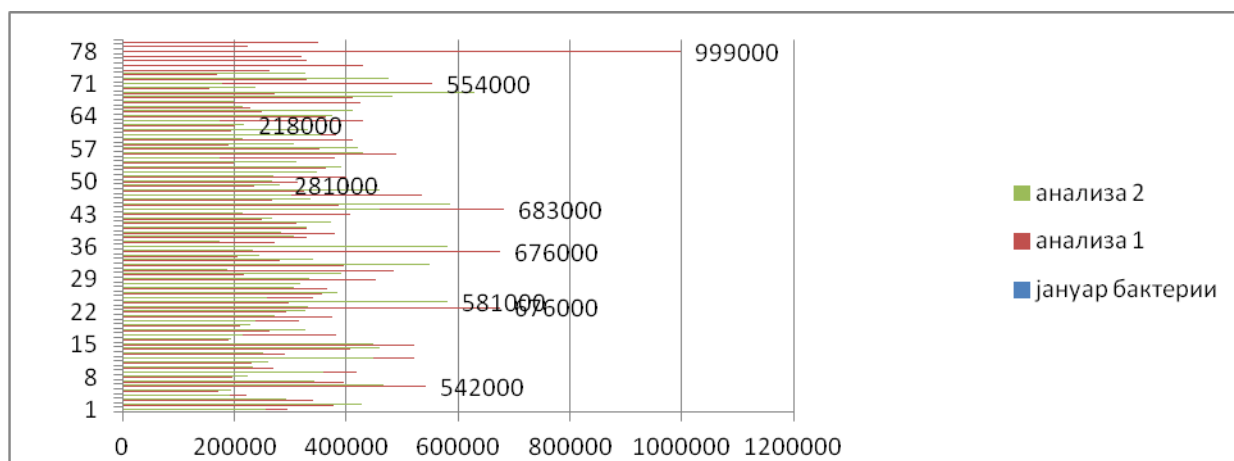
Месец	Анализа 1	Анализа 2	Средна вредност 1	Средна вредност 2
Јануари	80	72	348860,75 cfu/ml	326069,44 cfu/ml
Февруари	87	81	392069,76 cfu/ml	332160,49 cfu/ml
Март	102	102	464715,68 cfu/ml	454764,70 cfu/ml
Април	124	124	581274,19 cfu/ml	538637,09 cfu/ml
Мај	137	137	623395,6 cfu/ml	605548,18 cfu/ml
Јуни	137	137	538208,82	552102,9

Од извршените мерења во однос на вкупниот број на бактерии по месеци, добиени се следните резултати:

Зоран Арсевски

❖ Јануари

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 999000cfu/ml, а најмала измерена вредност на ВББ е 156 000cfu/ml (слика 14). Вкупно 18 примерока беа под пропишаните 200 000 cfu/ml според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



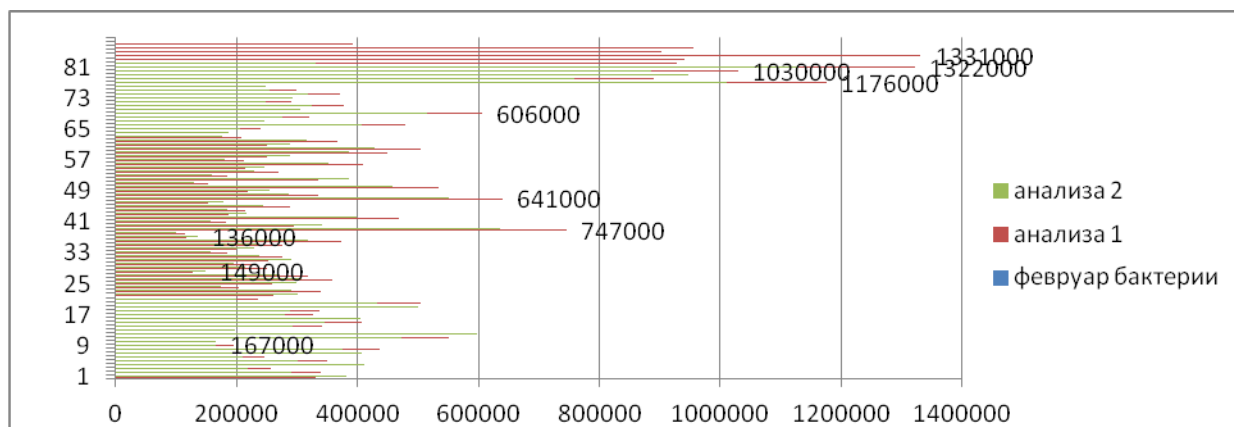
Слика 14. Вкупен број на бактерии за месец јануари

Figure 14. Total number of bacteria for January

❖ Февруари

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 1322000 cfu/ml, додека најмала измерена вредност на ВББ е 129 000 cfu/ml (слика 15). Триесет (30) примерока беа под пропишаните 200 000 cfu/ml, според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.

Зоран Арсевски

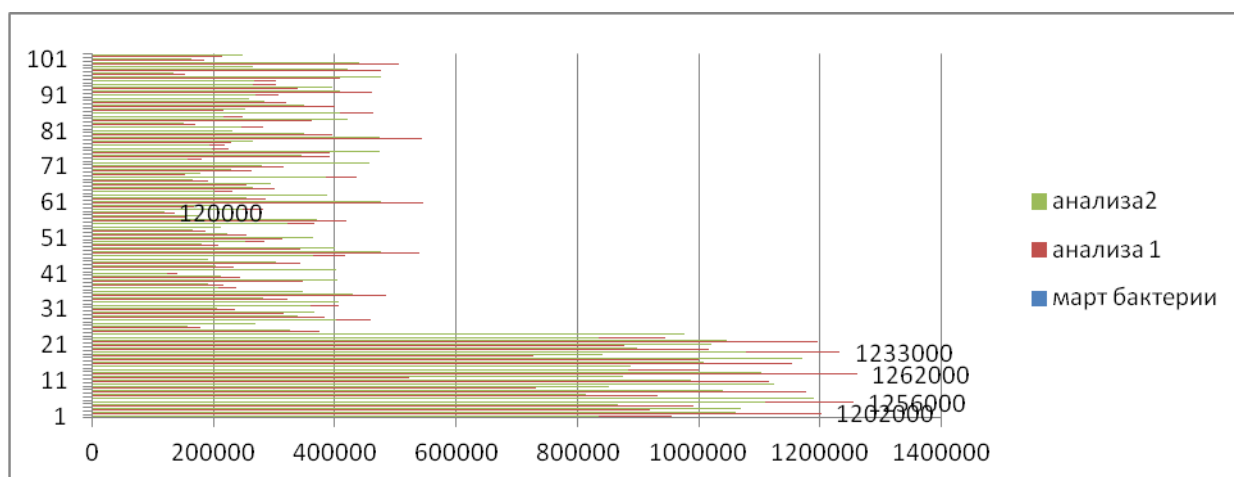


Слика 15. Вкупен број на бактерии за месец февруари

Figure 15. Total number of bacteria for Fevruar

❖ Март

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 1262000 *cfu/ml*, додека најмала измерена вредност изнесува 120 000 *cfu/ml* (слика 16). Триесет и два (32) примерока беа под пропишаните 200 000 *cfu/ml*, според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



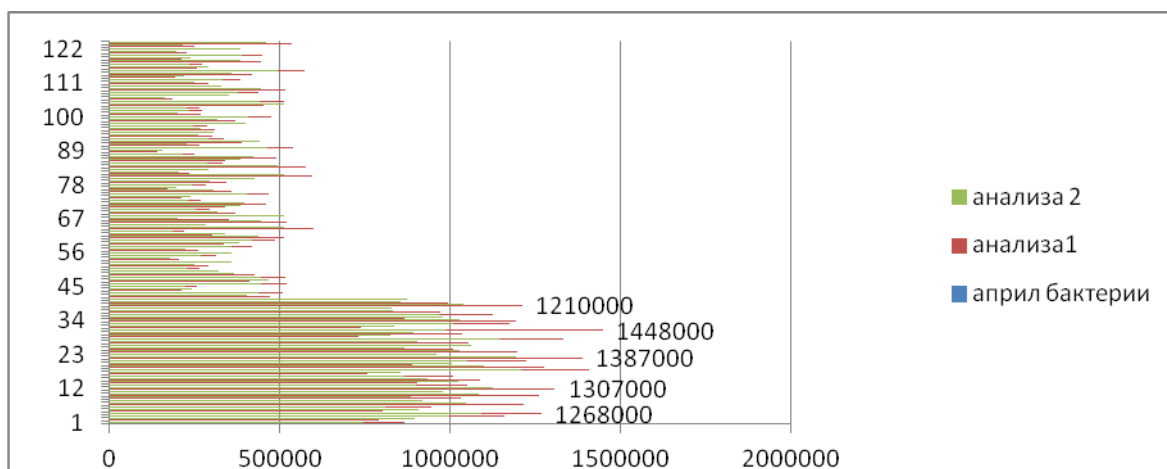
Слика 16. Вкупен број на бактерии за месец март

Figure 16. Total number of bacteria for March

Зоран Арсевски

❖ Април

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 11448000 *cfu/ml*, додека најмала измерена вредност изнесува 139000 *cfu/ml* (слика 17). Десет (10) примерока беа под пропишаните 200 000 *cfu/ml* според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



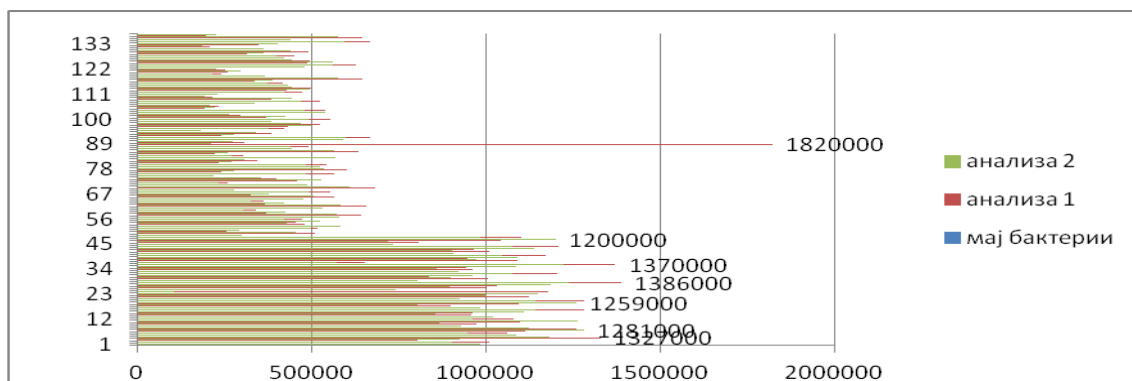
Слика 17. Вкупен број на бактерии за месец април

Figure 17. Total number of bacteria for April

❖ Мај

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 1820000 *cfu/ml*, додека најмала измерена вредност изнесува 105000 *cfu/ml* (слика 18). Единаесет (11) примерока беа под пропишаните 200 000 *cfu/ml* според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.

Зоран Арсевски

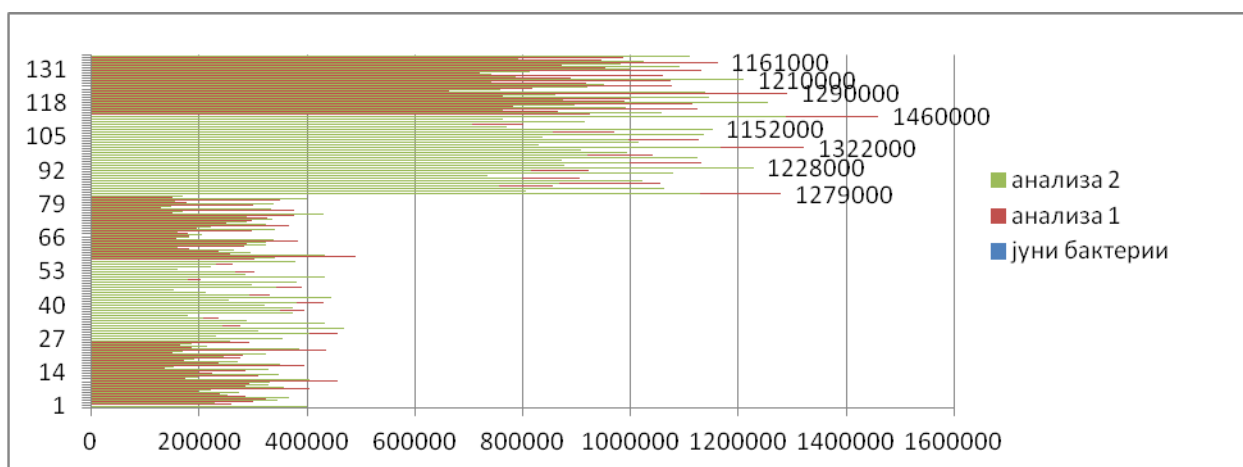


Слика 18. Вкупен број на бактерии за месец мај

Figure 18. Total number of bacteria for May

❖ Јуни

Најголема измерена вредност на ВББ изнесува 1460000 *cfu/ml*, додека најмала измерена вредност изнесува 129000 *cfu/ml* (слика 19). Триесет и осум (38) примерока беа под пропишаните 200 000 *cfu/ml* според националната регулатива, додека ниеден примерок не ги исполни ЕУ-стандардите за квалитет на млекото.



Слика 19. Вкупен број на бактерии за месец јуни

Figure 19. Total number of bacteria for Jun

Зоран Арсевски

Резултатите од истражувањето на Ангеловски и неговите соработници, покажале дека 41,45 % од мострите ги исполниле критериумите за ВББ, дадени во Правилникот за 2008 година. Во 2009 година повторно е спроведена истата студија од страна на истите истражувачи за утврдување на квалитетот на млекото и присуството на бактерии на територијата на Република Македонија. Добиените резултати покажуваат тенденција на подобрување на квалитетот на млекото бидејќи 56,20% од примероците ги исполнуваат зададените критериуми (Angelovski et al., 2009). Студиите се работени според Правилникот и границата за дозволен број на бактерии е 600 000 *cfu/ml*.

Резултатите од нашето истражување на мострите селектирани од Овчеполскиот Регион покажаа дека само 10,45% ги задоволуваат критериумите според Правилникот за изменување на правилникот за посебни барања за безбедност и хигиена и начинот на постапката за вршење на службените контроли на млеко и млечни производи (Службен весник на РМ, бр. 197 од 28.10.2016 година), каде границата за дозволен број на бактерии е 400 000 *cfu/ml*, додека пак ниту еден од примероците не одговараат на критериумите на европската легистатива.

Зоран Арсевски

Табела 5 Добиени резултати според Правилник

Table 5 Results obtained according to the rulebook

Година	БМО	Број на примероци	Национална легистатива	ЕУ легистатива
2008	0- 800 000 cfu/ml	2065	41,45 %	10.7%
2018	0- 200 000 cfu/ml	1320	10,45%	0%

Загадувањето на млекото со бактерии може да дојде од различни извори како што се: воздухот, опремата што се користи за молзење и складирање на млеко, храна, почва, измет, постелка, здравјето на животните и слабо ладење (Karmen & Teger, 2008).

5.2. Број на соматски клетки (БСК)

Од извршените анализи кај 479 примероци кои се земени еднаш месечно, 462 примерока ги задоволуваат националните и ЕУ-стандардите за БСК, како параметар за квалитетно млеко.

Измерените средни вредности покажуваат дека најголема вредност на БСК е 277743,90 scc/m во месец јуни, а најниска измерена средна вредност е 233701,3 scc/m во месец март.

Зоран Арсевски

Табела 4 Соматски клетки средни вредности по месеци

Table. 4 Somatic cell average values by months

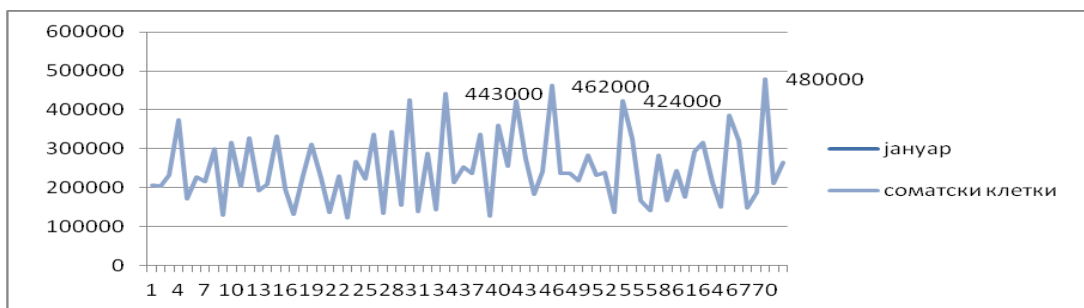
месец	Број на примероци	Средна вредност
Јануари	72	249736,11 <i>scc/ml</i>
Февруари	76	259723,7 <i>scc/ml</i>
Март	77	233701,3 <i>scc/ml</i>
Април	83	246797,59 <i>scc/ml</i>
Мај	89	266853,93 <i>scc/ml</i>
Јуни	82	277743,90 <i>scc/ml</i>

Анализите по месеци го покажуваат следното:

Зоран Арсевски

❖ Јануари

Од 72 примерока, само 6 примерока ја надминаа дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 480 000 *scc/ml*

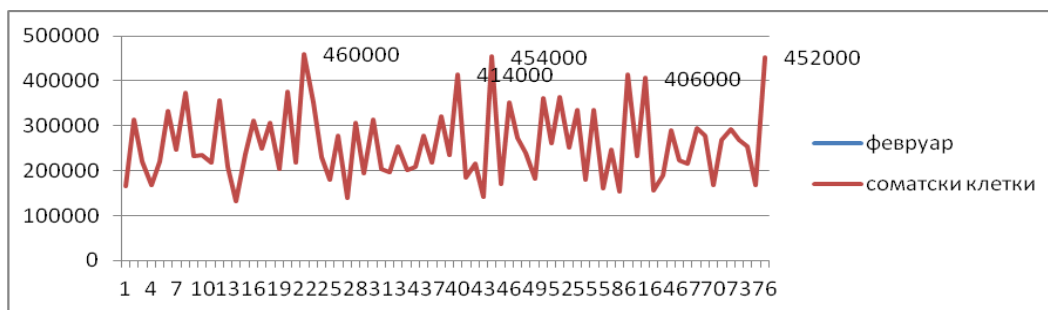


Слика 20. Број на соматски клетки за месец јануари

Figure 20. Number of somatic cells for January

❖ Февруари

Од вкупно 76 примероци, само 6 примерока ја надминаа дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 460 000 *scc/ml*



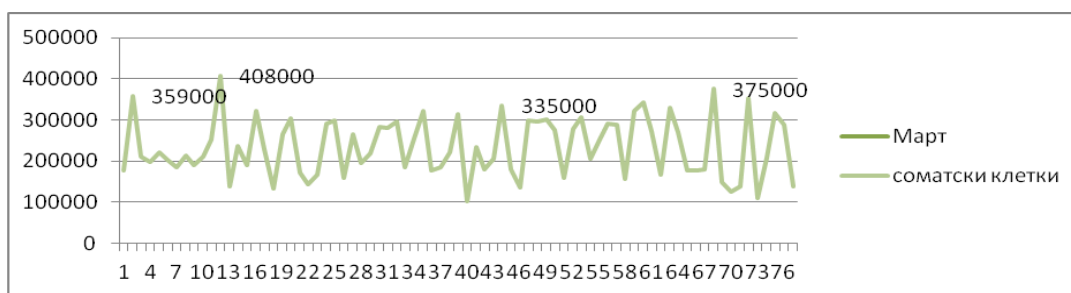
Слика 21. Број на соматски клетки за месец февруари

Figure 21. Number of somatic cells for February

Зоран Арсеvски

❖ Март

Од вкупно 77 примероци, само 1 примерок ја надмина дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 408 000 *scc/ml*.

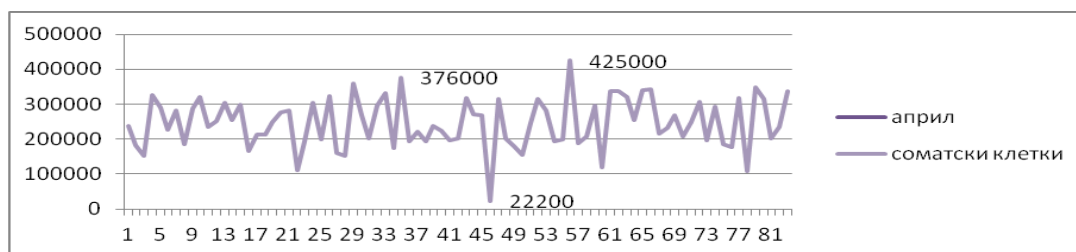


Слика 22. Број на соматски клетки за месец март

Figure 22. Number of somatic cells for March

❖ Април

Од вкупно 83 примероци, само еден (1) примерок ја надмина дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 425 000 *scc/ml*.



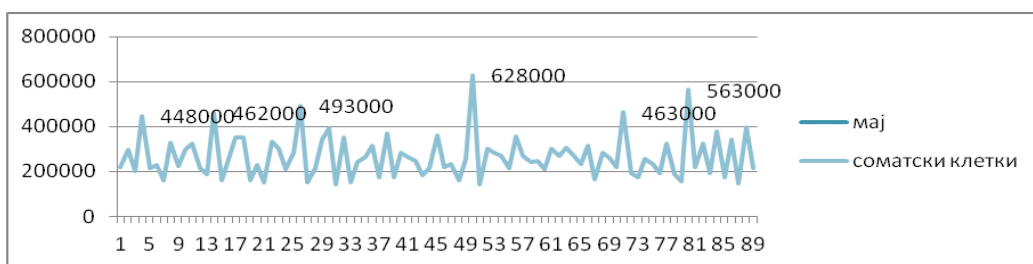
Слика 23. Број на соматски клетки за месец април

Figure 23. Number of somatic cells for April

Зоран Арсевски

❖ Мај

Од вкупно 89 примероци, само 6 примерока ја надминаа дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 628 000 *scc/ml*.

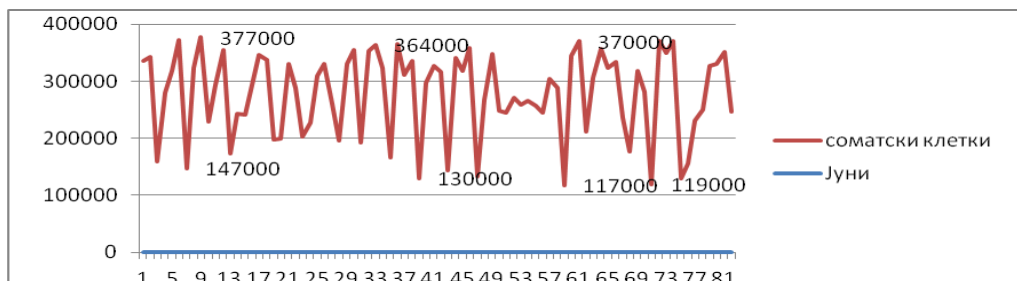


Слика 24. Број на соматски клетки за месец мај

Figure 24. Number of somatic cells for May

❖ Јуни

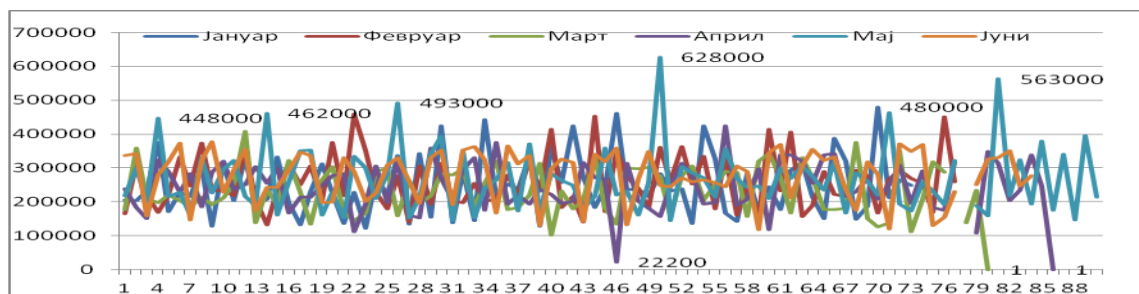
Од вкупно 82 примероци, ниту еден примерок не ја надмина дозволената граница на соматски клетки од 400 000 *scc/ml*, а најголема вредност беше измерена од 377 000 *scc/ml*.



Слика 25. Број на соматски клетки за месец јуни

Figure 25. Number of somatic cells for Jun

Зоран Арсевски



Слика 26. Број на соматски клетки од јануари до јуни

Figure 26. Number of somatic cells from January to June

Зоран Арсевски

Табела 6. Добиени резултати според Правилник

Table 6. Results obtained according to the rulebook

Година	БСК	Број на примероци	Национална легислатива	ЕУ-легислатива
2008	0-600 000	1625 scc/ml	41,8 %	42,7%
2018	0- 400 000	482 scc/ml	95,8%	95,8%

Од изработената студија за БСК од страна на Ангеловски и неговите соработници на Факултетот за ветеринарна медицина и од добиените резултати во истата, од 1625 примероци, 41,8% ги исполниле критериумите за БСК според Правилникот за 2008 година, додека според барањата на Council Directive, 42,7% од примероци ги исполниле условите на Европската Унија (Angelovski et al., 2008). Според нашите истражувања и добиените резултати од 479 примерока собрани во Овчеполскиот Регион, 95,8% ги задоволија критериумите пропишани во Правилникот од 2016 год., каде максималниот број на соматски клетки може да биде 400.000 cfu/ml во суровото кравјо млеко, а исто така, задоволени се и ЕУ-стандардите за квалитет на млеко.

Идентификувањето на факторите на ризик, специфични за одредени области или специфични за одредена фарма, се пресудни во контролните програми за маститис кај кравите (Almaw, Molla & Melaku, 2012).

Од горенаведените резултати може да се констатира дека млекото во однос на БСК е со добар квалитет и станува збор за исклучиво здрави грла говеда со низок процент на заболени од маститис и добра контрола на млечната жлезда.

Зоран Арсевски

5.3. Афлатоксин M1

Анализите за афлатоксин M1 во Овчеполскиот Регион во истражувањето спроведено од Димитриевска-Стојковиќ и нејзините соработници, покажаа дека од вкупниот број на тестирани примероци (3635), кај 1539 (42.3%) беше детектиран афлатоксинот AFM₁ (Dimitrievska-Stojković et al., 2016). Од нив, 105 примерока (2.9%) содржеа микотоксин во концентрации над дозволената граница во периодот од февруари 2013 година, до јануари 2014 година. Во Овчеполскиот Регион за време на инцидентот со микотоксинот во 2013 година, бројот на тестирани примероци беше 60, селектирани од март 2013 година, до ноември 2014 година. Тие беа анализирани за AFM₁ со ELISA-методот. Кај два примерока беше констатирана концентрација од 0,05 ng/kg и кај истите е направена дополнителна анализа со HPLC флуоросцентен детектор, како конфирмирачки метод. Концентрациите на AFM₁ кај двата примерока (3,3%) го надминаа максимумот на дозволените нивоа, а највисоко детектираната концентрација беше 0,58 ng/kg, што е за 0,08 ng/kg над дозволената граница.

Зоран Арсевски

6. Заклучок

Квалитетот на суровото млекото од Овчеполскиот Регион беше цел на истражувањето во ова магистерска теза. Резултатите од истражувањето покажаа дека квалитетот на суровото млеко во однос на бројот на соматски клетки (БСК) и присуство на афлатоксинот е на задоволително ниво.

Главниот проблем за квалитетот на суровото млеко селектирано од Овчеполскиот Регион е зголемениот број на бактерии. Овој проблем може да се реши со едукација на фармерите за поголема хигиена при молзењето, транспорт и складирање на збирното млеко.

Вториот пристап кон решавање на овој проблем е стимулација на фармерите за инвестиција во автоматизирани линии за измолзување, наместо мануелно молзење, со што би се избегнало микробиолошко загадување на суровото млеко.

Зоран Арсеvски

7. ПРИЛОЗИ

Во прилозите табеларно се претставени сите резултати кои беа добиени како резултат на истражувањето во овој магистерски труд, а во делот резултати и дискусија се претставени табеларно.

Вкупен број на Бактерии

1	Резултат 1 Јануари	Резултат 2 Јануари	Резултат 1 февруари	Резултат 2 Февруари	Резултат 1 Март	Резултат 2 Март
2	294000	255000	331000	381000	956000	835000
3	377000	427000	340000	292000	1202000	1062000
4	341000	293000	258000	220000	920000	1070000
5	221000	192000	358000	412000	991000	866000
6	171000	193000	351000	302000	1256000	1110000
7	542000	466000	247000	210000	1022000	1189000
8	395000	343000	354000	408000	932000	814000
9	197000	223000	436000	375000	1178000	1041000
10	418000	359000	196000	167000	732000	852000
11	269000	233000	145000	167000	947000	1124000
12	230000	260000	551000	474000	1117000	987000
13	522000	449000	415000	597000	522000	875000
14	291000	252000	172000	198000	1262000	1103000
15	407000	461000	342000	294000	1000000	884000
16	521000	448000	408000	347000	762000	887000
17	190000	195000	351000	405000	1155000	1009000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

18	382000	215000	326000	280000	999000	1172000
19	263000	328000	338000	288000	728000	842000
20	210000	228000	435000	501000	1233000	1077000
21	315000	238000	504000	433000	1017000	899000
22	376000	271000	236000	201000	877000	1020000
23	293000	326000	262000	302000	1197000	1046000
24	676000	332000	339000	291000	946000	836000
25	297000	581000	204000	174000	840000	977000
26	340000	258000	259000	299000	374000	327000
27	356000	385000	358000	308000	179000	158000
28	366000	306000	319000	272000	232000	270000
29	294000	317000	129000	149000	460000	402000
30	454000	333000	250000	215000	384000	339000
31	217000	390000	229000	195000	315000	367000
32	485000	188000	253000	291000	236000	206000
33	396000	549000	276000	237000	406000	359000
34	281000	340000	186000	158000	349000	406000
35	206000	244000	200000	230000	322000	281000
36	676000	233000	276000	237000	485000	429000
37	201000	581000	373000	318000	299000	348000
38	271000	174000	118000	136000	238000	208000
39	330000	307000	116000	100000	216000	191000
40	380000	284000	747000	636000	347000	404000
41	330000	330000	296000	341000	244000	213000
42	311000	373000	184000	158000	140000	124000
43	248000	267000	469000	399000	346000	403000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

44	407000	215000	188000	217000	233000	204000
45	683000	460000	215000	185000	343000	303000
46	387000	587000	288000	245000	164000	191000
47	267000	336000	154000	178000	417000	364000
48	536000	302000	641000	551000	539000	476000
49	324000	461000	336000	286000	344000	400000
50	236000	281000	220000	254000	207000	181000
51	314000	267000	534000	459000	285000	252000
52	400000	270000	154000	131000	314000	365000
53	346000	347000	335000	386000	255000	223000
54	363000	391000	185000	159000	187000	165000
55	199000	312000	269000	229000	182000	212000
56	379000	173000	214000	247000	367000	321000
57	490000	429000	410000	352000	419000	370000
58	353000	421000	213000	181000	152000	177000
59	190000	306000	250000	288000	137000	120000
60	412000	215000	450000	387000	281000	248000
61	383000	354000	504000	429000	168000	196000
62	193000	332000	250000	288000	546000	477000
63	201000	218000	368000	316000	287000	254000
64	431000	173000	208000	177000	333000	387000
65	364000	374000	163000	188000	231000	202000
66	249000	412000	240000	206000	300000	265000
67	228000	214000	479000	408000	254000	295000
68	426000	198000	214000	247000	190000	166000
69	412000	482000	321000	276000	436000	385000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

70	273000	630000	606000	516000	154000	179000
71	156000	237000	265000	305000	263000	230000
72	554000	177000	378000	325000	316000	279000
73	329000	476000	292000	249000	393000	457000
74	168000		254000	293000	181000	158000
75	263000		371000	319000	391000	346000
76	430000		299000	255000	391000	475000
77	330000		215000	248000	225000	197000
78	320000		1176000	1011000	218000	193000
79	999000		890000	758000	228000	265000
80	225000		822000	947000	544000	475000
81			1030000	885000	395000	349000
82			1322000	1126000	199000	232000
83			928000		282000	246000
84			941000		170000	150000
85			1331000		363000	422000
86			902000		248000	217000
87			956000		463000	409000
88					217000	252000
89					401000	350000
90					320000	283000
91					222000	258000
92					308000	269000
93					462000	408000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

94					339000	395000
95					303000	265000
96					302000	267000
97					409000	476000
98					153000	134000
99					476000	421000
100					228000	265000
101					505000	441000
102					184000	163000
103					214000	249000

1	Резултат 1 Април	Резултат 2 Април	Резултат 1 Мај	Резултат 2 Мај	Резултат 1 Јуни	Резултат 2 Јуни
2	866000	744000	853000	983000	355000	399000
3	791000	895000	1010000	901000	259000	229000
4	1160000	997000	802000	924000	301000	345000
5	1268000	1090000	1327000	1183000	325000	366000
6	802000	907000	942000	1086000	285000	252000
7	944000	811000	1060000	945000	239000	274000
8	1216000	1045000	1112000	1281000	197000	222000
9	812000	919000	1258000	1122000	405000	358000
10	1031000	886000	806000	929000	287000	329000
11	1259000	1082000	972000	867000	293000	330000
12	864000	978000	1096000	1263000	458000	404000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

13	1307000	1123000	1077000	960000	174000	199000
14	1048000	901000	884000	1019000	309000	348000
15	905000	1024000	959000	855000	225000	199000
16	1088000	935000	961000	1108000	286000	328000
17	1009000	867000	1280000	1141000	136000	153000
18	757000	856000	853000	983000	396000	350000
19	1407000	1209000	898000	801000	237000	271000
20	1276000	1097000	1093000	1259000	171000	192000
21	888000	1005000	1280000	1141000	277000	245000
22	1221000	1049000	803000	925000	282000	323000
23	1387000	1192000	1124000	1002000	150000	169000
24	848000	959000	996000	1148000	436000	385000
25	1197000	1029000	1177000	105000	187000	214000
26	1008000	866000	644000	742000	166000	187000
27	938000	1061000	1001000	893000	292000	258000
28	1052000	904000	1029000	1186000	311000	356000
29	1331000	1144000	1386000	1236000	206000	232000
30	730000	826000	698000	804000	458000	404000
31	1036000	890000	1006000	897000	271000	310000
32	1448000	987000	834000	961000	418000	470000
33	737000	834000	1204000	1074000	276000	244000
34	1172000	1007000	799000	921000	378000	433000
35	1194000	1026000	962000	858000	256000	288000
36	865000	979000	942000	1085000	236000	208000
37	1126000	968000	1370000	1222000	157000	180000
38	969000	833000	652000	57100	331000	373000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

39	732000	828000	1091000	973000	395000	349000
40	1210000	1040000	947000	1091000	327000	375000
41	995000	855000	1171000	1044000	285000	321000
42	771000	872000	785000	905000	430000	380000
43	470000	404000	1010000	901000	222000	254000
44	508000	437000	966000	1136000	396000	446000
45	213000	241000	1206000	1075000	331000	292000
46	258000	222000	637000	734000	186000	213000
47	519000	446000	806000	719000	136000	153000
48	412000	466000	1041000	1200000	390000	344000
49	515000	443000	1102000	983000	260000	298000
50	424000	364000	260000	300000	339000	382000
51	283000	320000	508000	453000	202000	178000
52	265000	228000	254000	293000	378000	433000
53	290000	249000	515000	499000	254000	286000
54	316000	358000	504000	581000	302000	267000
55	205000	176000	478000	426000	139000	159000
56	313000	269000	453000	522000	197000	222000
57	316000	358000	471000	420000	263000	232000
58	261000	224000	501000	577000	331000	379000
59	419000	360000	641000	572000	302000	340000
60	337000	381000	369000	425000	490000	433000
61	485000	417000	338000	301000	258000	296000
62	511000	439000	461000	531000	235000	265000
63	300000	340000	654000	583000	181000	160000
64	218000	187000	36400	420000	283000	324000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

65	598000	514000	362000	323000	288000	324000
66	250000	283000	413000	476000	383000	338000
67	518000	445000	565000	504000	158000	181000
68	351000	202000	325000	375000	182000	205000
69	453000	513000	552000	492000	180000	159000
70	368000	316000	240000	277000	298000	341000
71	296000	254000	681000	607000	196000	221000
72	340000	385000	421000	485000	367000	324000
73	461000	396000	260000	232000	251000	288000
74	268000	230000	457000	527000	299000	337000
75	211000	239000	398000	355000	327000	289000
76	468000	402000	189000	218000	377000	432000
77	357000	307000	563000	484000	150000	169000
78	172000	195000	240000	276000	377000	333000
79	283000	243000	601000	536000	129000	148000
80	343000	295000	454000	523000	301000	339000
81	375000	424000	541000	482000	176000	155000
82	596000	512000	233000	269000	350000	401000
83	236000	203000	344000	307000	150000	169000
84	257000	291000	493000	568000	1279000	1129000
85	575000	494000	303000	270000	704000	806000
86	332000	285000	223000	257000	945000	1063000
87	341000	386000	634000	565000	855000	755000
88	491000	422000	383000	441000	1055000	867000
89	249000	214000	491000	438000	907000	1021000
90	139000	157000	1820000	210000	905000	799000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

91	540000	464000	307000	274000	641000	734000
92	265000	228000	510000	588000	958000	1078000
93	389000	440000	667000	595000	923000	815000
94	336000	289000	241000	278000	1072000	1228000
95	303000	260000	382000	341000	780000	878000
96	270000	306000	158000	182000	1131000	999000
97	311000	267000	422000	376000	762000	873000
98	285000	245000	432000	498000	1000000	1125000
99	354000	401000	525000	468000	1041000	919000
100	370000	318000	332000	383000	868000	994000
101	474000	407000	552000	492000	806000	907000
102	267000	202000	369000	425000	1322000	1167000
103	271000	233000	294000	262000	72400	829000
104	264000	227000	467000	538000	901000	1014000
105	452000	512000	537000	479000	1127000	995000
106	513000	441000	191000	220000	731000	837000
107	187000	161000	233000	208000	1009000	1136000
108	308000	349000	291000	335000	971000	857000
109	437000	376000	524000	467000	1006000	1152000
110	515000	443000	383000	441000	685000	771000
111	289000	327000	215000	192000	801000	707000
112	291000	250000	198000	228000	799000	915000
113	386000	332000	473000	422000	678000	763000
114	193000	218000	428000	493000	1460000	1289000
115	419000	360000	497800	443000	924000	1058000
116	572000	492000	374000	431000	866000	764000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

117	255000	289000	416000	371000	1123000	992000
118	272000	234000	336000	387000	782000	896000
119	446000	383000	646000	576000	1114000	1254000
120	211000	239000	318000	366000	990000	874000
121	450000	387000	239000	213000	1000000	1145000
122	227000	195000	258000	297000	764000	860000
123	341000	386000	251000	224000	1290000	1139000
124	250000	215000	417000	480000	663000	759000
125	534000	459000	627000	559000	817000	920000
126			485000	559000	1077000	951000
127			495000	441000	917000	743000
128			366000	422000	1075000	1210000
129			449000	400000	890000	786000
130			312000	360000	1060000	741000
131			491000	438000	721000	812000
132			315000	363000	1131000	999000
133			206000	184000	954000	1092000
134			348000	401000	873000	982000
135			666000	594000	1161000	1025000
136			380000	438000	947000	791000
137			644000	574000	986000	1110000
138			196000	226000		

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

Соматски Клетки

Реден број	Број на соматски клетки	Јануари	Февруари	Март	Април	Мај	Јуни
1	scc/ml	206000	165000	177000	238000	218000	336000
2	scc/ml	204000	313000	359000	183000	299000	343000
3	scc/ml	233000	221000	210000	151000	201000	159000
4	scc/ml	375000	169000	198000	325000	448000	280000
5	scc/ml	172000	220000	221000	290000	217000	319000
6	scc/ml	228000	333000	203000	228000	228000	373000
7	scc/ml	215000	246000	186000	283000	161000	147000
8	scc/ml	299000	374000	214000	186000	330000	323000
9	scc/ml	129000	233000	191000	288000	226000	377000
10	scc/ml	315000	236000	211000	321000	296000	229000
11	scc/ml	204000	219000	252000	236000	323000	294000
12	scc/ml	328000	356000	408000	251000	215000	355000
13	scc/ml	193000	208000	139000	303000	190000	174000
14	scc/ml	208000	133000	237000	254000	462000	243000
15	scc/ml	333000	237000	191000	300000	161000	242000
16	scc/ml	197000	312000	322000	167000	258000	293000
17	scc/ml	132000	250000	229000	214000	351000	346000
18	scc/ml	231000	307000	134000	213000	353000	337000
19	scc/ml	312000	203000	266000	248000	160000	198000
20	scc/ml	226000	376000	304000	277000	228000	199000
21	scc/ml	137000	218000	172000	283000	153000	331000
22	scc/ml	229000	460000	144000	112000	335000	289000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

23	scc/ml	122000	351000	166000	194000	300000	202000
24	scc/ml	268000	229000	291000	305000	209000	227000
25	scc/ml	222000	180000	298000	198000	281000	309000
26	scc/ml	337000	277000	158000	323000	493000	331000
27	scc/ml	134000	140000	264000	161000	152000	261000
28	scc/ml	343000	306000	196000	152000	214000	195000
29	scc/ml	155000	194000	219000	360000	343000	331000
30	scc/ml	425000	314000	283000	269000	393000	354000
31	scc/ml	139000	203000	280000	203000	144000	192000
32	scc/ml	289000	197000	297000	295000	352000	353000
33	scc/ml	144000	255000	185000	331000	152000	364000
34	scc/ml	443000	201000	255000	175000	240000	324000
35	scc/ml	214000	208000	321000	376000	266000	166000
36	scc/ml	252000	279000	177000	194000	316000	365000
37	scc/ml	236000	218000	184000	220000	173000	312000
38	scc/ml	337000	322000	220000	194000	371000	336000
39	scc/ml	128000	234000	314000	237000	174000	130000
40	scc/ml	361000	414000	101000	223000	284000	297000
41	scc/ml	256000	184000	233000	196000	264000	327000
42	scc/ml	424000	216000	179000	201000	248000	317000
43	scc/ml	274000	141000	205000	317000	182000	143000
44	scc/ml	184000	454000	335000	272000	215000	340000
45	scc/ml	242000	170000	181000	268000	360000	318000
46	scc/ml	462000	351000	135000	22200	220000	359000
47	scc/ml	236000	274000	300000	314000	233000	133000
48	scc/ml	237000	240000	297000	202000	161000	267000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

49	scc/ml	217000	182000	301000	181000	257000	348000
50	scc/ml	283000	361000	275000	156000	628000	249000
51	scc/ml	232000	260000	159000	246000	144000	245000
52	scc/ml	239000	364000	278000	315000	303000	271000
53	scc/ml	136000	252000	306000	281000	285000	258000
54	scc/ml	424000	335000	206000	194000	271000	266000
55	scc/ml	326000	179000	251000	198000	213000	257000
56	scc/ml	167000	336000	290000	425000	358000	245000
57	scc/ml	142000	160000	288000	189000	269000	305000
58	scc/ml	283000	247000	156000	208000	243000	289000
59	scc/ml	168000	153000	321000	297000	247000	117000
60	scc/ml	244000	415000	343000	118000	210000	344000
61	scc/ml	177000	232000	273000	338000	300000	370000
62	scc/ml	293000	406000	167000	338000	270000	212000
63	scc/ml	317000	156000	331000	321000	306000	306000
64	scc/ml	213000	189000	271000	254000	275000	356000
65	scc/ml	150000	289000	177000	339000	235000	323000
66	scc/ml	387000	222000	177000	343000	316000	333000
67	scc/ml	320000	215000	181000	215000	166000	236000
68	scc/ml	148000	294000	375000	231000	285000	176000
69	scc/ml	188000	278000	150000	269000	261000	318000
70	scc/ml	480000	167000	125000	208000	221000	282000
71	scc/ml	212000	268000	138000	250000	463000	119000
72	scc/ml	265000	293000	352000	308000	193000	371000
73	scc/ml		269000	111000	195000	174000	350000
74	scc/ml		255000	207000	292000	258000	370000

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

75	scc/ml		169000	318000	184000	232000	130000
76	scc/ml		452000	288000	176000	192000	155000
77	scc/ml			138000	318000	323000	230000
78	scc/ml				107000	189000	250000
79	scc/ml				348000	158000	326000
80	scc/ml				314000	563000	330000
81	scc/ml				203000	219000	351000
82	scc/ml				234000	324000	247000
83	scc/ml				338000	194000	
84	scc/ml					380000	
85	scc/ml					176000	
86	scc/ml					341000	
87	scc/ml					146000	
88	scc/ml					396000	
89	scc/ml					213000	

Зоран Арсевски

8. Користена литература

- 1.Almaw, G., Molla, W. & Melaku, A. 2012 Incidence rate of clinical bovine mastitis in selected smallholder dairy farms in Gondar Town in Ethiopia. Ethiopian Veterinary Journal, 16(1): 93–99.
- 2.Ангеловски, Љ.,Јанкуловски, Д., Костова, С., Раткова, М., Ераковиќ Токалиќ, И., Секуловски, П. (2008) Квалитетот на суровото кравјо млеко во Република Македонија согледан преку испитување на бројот на соматските клетки и бројот на микроорганизми.Македонски ветеринарен преглед Вол.31,Но.
- 3.Ангеловски, Љ.,Секуловски, П.,Јанкуловски, Д.,Раткова, М.,Костова, С.,Проданов,М. (2009) Фактори за појава на висок број на бактерии во суровото кравјо млеко Македонски ветеринарен преглед Вол 32, Бр.1; 37 - 43, 2009
- 4.AOAC Official Method 971.24, First Action 1971 and Final Action 1988 (AOAC Official Method 971.24, 2000)
- 5.AOAC Official Method 2000.08 (2005). Aflatoxin M1 in liquid milk, immunoaffinity column by liquid chromatography. Natural Toxins-chapter 49 (pp. 45-47). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, AOAC International. Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA
- 6.Applebaum, R. S.; Brackett, R. E.; Wiseman, D. W.; & Marth, E. H. (1982). Aflatoxins: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. Journal of Food Protection, No. 45, pp. (752-777)
- 7.Auldish, M. 2011. Milk quality and udder health effects on processing characteristics. pp. 902–907, in: Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd edition).
- Aycicek, H., Aksoy, A. & Saygi, S. (2005). Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. Food Control, Vol.16, No.3, pp. 263-266

Зоран Арсевски

- 8.Bansal, B.K., Hamann, J., Grabowski, T.N. & Singh, K.B. 2005. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *Journal of Dairy Research*, 72(2): 144–152.
- 9.Batavani, R.A., Asri, S. & Naebzadeh, H. 2007. The effect of sub-clinical mastitis on milk composition in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8(3): 205–211.
- 11.Battaccone, G.; Nudda, A.; Cannas, A.; Cappio Borlino, A.; Bomboi, G.; & Pulina, G. (2003). Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, No. 86, pp. (2667-2675)
- 12.Battilani, P. (2004). Ferite alle cariossidi e umidita` favoriscono i funghi aflatossigeni. *L'Informatore Agrario*, 14- 47.
- 13.Blount, W.P.(1961). Turkey "X" disease. *Turkeys*, Vol. 9, No. 2, pp. (52, 55-58, 61,77)
- 14.Bramley, A.J. and C.H. McKinnon. 1990. Themicrobiology of raw milk. pp. 163-208 In *DairyMicrobiology*, Vol. 1. Robinson, R.K. (ed.)Elsevier Science Publishers, London
- Burvenich, C., A.J. Guidry, M.J. Paape. 1995.Natural defense mechanisms of the lactating and dry mammary gland (overview paper). *Proc. 3rd IDF Int. Mastitis Seminar*. Tel Aviv, Israel
- 15.Codex Alimentarius Commissions .(2001). Comments submitted on the draft maximum level for Aflatoxin M1 in milk. Codex committee on food additives and contaminants 33rd sessions, Hauge, The Netherlands.
- 16.Decastelli, L.; Lai, J.; Gramaglia, M.; Monaco, A.; Nachtmann, C.; Oldano, F.; Ruffer, M.; Sezian, A.; Bandirola, C. (2007). Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. *Food Control*, No. 18, pp. (1263–1266)
- 17.Detroy, R. W.; Lillehoj, E. B. and Ciegler, A. (1971). Aflatoxin and related compounds, p. 3–178. In: A. Ciegler, S. Kadis, and S. J. Ajl (ed.), *Microbial toxins*, vol. VI: Fungal toxins. Academic Press, New York, N.Y.

Зоран Арсевски

18.Diener, U. L.; Cole, R. J.; Sanders, T. H.; Payne, G. A.; Lee, L. S.and Klich, M. A. (2001). Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Annu. Rev. Phytopathol., 25:249–270

Dohoo, I.R. and A.H.Meek. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. Can. Vet. J. 23:119-125

19.Dragacci, S., Grosso, F., & Gilbert, J. (2001). Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: Collaborative study. Journal of AOAC International, Vol.84 No.2, pp. 437-443

20.EY, EC853/2004 (Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin).

European Commission. (2013). Rapid alert system for food and feed. Retrieved 22.07.2013 http://ec.europa.eu/food/foodrapid alert/index_en.htm.

21.Galvano, F.; Galofaro, V.; & Galvano, G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. Journal of Food Protection, No. 10, pp. (1079-1090)

FAO, 1997).

22.Fernandes, A.M., C.A.F. Oliveira, P. Tavolaro.2004. Relationship between somatic cell counts and composition of milk from individual Holstein cows. Arq. Inst. Biol. 71 (2): 163-166.

23.Gera, S. & Guha, A. 2011. Assessment of acute phase proteins and nitric oxide as indicator of subclinical mastitis in Holstein × Haryana cattle. Indian Journal of Animal Sciences, 81(10): 1029–1031.

24.Gehringer, G. (1980). Multiplication of bacteria during farm storage. In Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. International Dairy Federation Bulletin, Document 120)

Зоран Арсевски

- 25.Ghorbanian, M.; Razzaghi-Abyaneh, M.; Allameh, A.; Shams-Ghahfarokhi, M. and Qorbani, M. (2008). Study of the effect of neem (Azadirachata indica) leaf extract on the growth of fungi. *Mycosis*, 51 (1): 35-39.
- 26.Gong, Y.; Hounsa, A.; Egal, S.; Turner, P. C.; Sutcliffe, A. E.; Hall, A. J.; Cardwell, K.; & Wild, C. P. (2004). Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives*, No. 112, pp. (1334–1338)
- 27.Guzman, D. (2007). Exposure to aflatoxin B1 in experimental animals and its public health signification. *Salud Publica Mex.*, 49 (3): 227-235.
- 28.Grant, D. W.; & Carlson, F. W. (1971). Partitioning behavior of aflatoxin M1 in dairy products. *Bulletin of the Environmental Contamination and Toxicology*, No. 6, pp. (521-524)
- Hameed, K.G.A., Sender, G. & Korwin-Kossakowska, A. 2007. Public health hazard due to mastitis in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 25(2): 73–85.
- 29.Hegde, R., Isloor, S., Nithin Prabhu, K., Shome, B.R., Rathnamma, D., Suryanarayana, V.V.S., Yatiraj, S., Hogan, J. 2005. Human health risks associated with high SCC milk. pp. 21–124, in: *Proceedings of the British Mastitis Conference, 2005*. Stoneleigh, Warwickshire, UK, 12 October 2005. Institute for Animal Health. Available at <http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC2005Proceedings.pdf> Accessed 2013-07-25.
- 30.Hogeveen, H. 2005. Mastitis is an economic problem. pp. 1–13, in: *Proceedings of British Mastitis Conference (2005)* Stoneleigh. Institute for Animal health/ The Dairy Group. Available at <http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC2005Proceedings.pdf> Accessed 2013-07-08
- 31.IARC. (1993). Some naturally occurring substances - food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum*, Lyon, France, 56, pp. (245–391)

Зоран Арсевски

- 32.IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum, Lyon, France, pp. 1–556
- 33.Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A., & Trucksess, M.W. (2013). Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. Food Control, 29(1), 1e6. Kabak, B., & Ozbey, F. (2012).
- 34.IFAD (International Fund for Agricultural Development). 2004. Livestock services and the poor. A global initiative. Collecting, coordinating and sharing experiences. IFAD, Rome, Italy. 132 p
- Islam, M.A., Islam, M.Z., Islam, M.A., Rahman, M.S. & Islam, M.T. 2011. Prevalence of sub-clinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine, 9(1): 73–78.
- 35.Ito, Y.; Peterson, S. W.; Wicklaw, D. T.; & Goto T. (2001). Aspergillus pseudotamarii, a new aflatoxin producing sp. Mycology Research, No.105, pp. (233-239)
- 36.Jay, J. M. (1992). Modern food microbiology, pp. (1–701), Chapman and Hall, New York Jose Barrios, M. ; Jesus Gualda, M. ; Cabanas, J. M. ; Medina, L. M. ; & Jordano, R. (1996). Occurrence of aflatoxin M1 in cheeses from the South of Spain, Journal of Food Protection, No. 8, pp. (898-900)
- 37.JECFA, (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food prepared by the 56th meeting of the JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), FAO Food and Nutrition Paper 74/WHO Foods Additives Series 47.
- 38.Jones, G.M. 2006. Understanding the basics of mastitis. Virginia Cooperative Extension, Publication 404-233. 7 p. Virginia State University, USA.
- 39.Kehrli, M.E. Jr., D.E. Shuster. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 77: 619-627. J. Ramesh, G. Sarathchandra, and V. Sureshkumar, “Analysis of feed samples for aflatoxin b1 contamination by hptlc-a validated method,” International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, vol. 2, pp. 373–377, 2013.

Зоран Арсеvски

- 40.Kiermeier, F. (1973). Aflatoxins residues in fluid milk. Pure Applied Microbiology, No. 35, pp. (271-273)
- 41.Kitchen, B.J. 1981. Review of the progress of dairy science - bovine mastitis - milk compositional changes and related diagnostic-tests. Journal of Dairy Research, 48(1): 167–188
- 42.Klich, M. A. (1987). Relation of plant water potential at flowering to subsequent cottonseed infection by *Aspergillus flavus*. Phytopathology, 77: 739–741
- 43.Kivaria, F.M. 2006. Epidemiological studies on bovine mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam Region, Tanzania. Doctoral thesis, Utrecht University, The Netherlands.
- Seegers, H., Fourichon, C. & Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research, 34: 475–491.
- 44.Kurtzman, C. P.; Horn, B. W. & Hesseltine, C. (1987). A new species, a new aflatoxin producing species related to *A. flavus* and *A. Tamarii*. Antonie Van Leeuwenhoek, No. 53, pp. (147-158)
- 45.Lafont, P.; Siriwardana, M.; & Lafont, J. (1989). Genotoxicity of hydroxy-aflatoxins M1 and M4. Microbiology Alimentary Nutrition, NO. 7, pp (1-8)
- 46.Marsi, M. S.; Booth, A. N.; & Hsieh, D. P. H. (1974). Comparative metabolic conversion of aflatoxin B1 in aflatoxin M1 and Q1. Life Science, No. 15, pp (203-209)
- 47.Mekonnen, H. & Tesafaye, A. 2010. Prevalence and etiology of mastitis and related management factors in market oriented smallholder dairy farms in Adama, Ethiopia. Revue de Medecine Veterinaire, 161(12): 574–579
- 48.Moreau, C. (1976). Les mycotoxines dans les produits laitiers. Lait, No. 55, pp. (286-303)
- 49.Mortimer, D. N., Gilbert, J., & Shepherd, M. J. (1987). Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M1 in liquid and powdered milks using affinity column clean-up. Journal of Chromatography, Vol.407, pp. 393-398

Зоран Арсевски

- 50.Muhammad, G., Naureen, A., Nadeem Asi, M., Saqib, M. & Fazul-ur-Rehman. 2010. Evaluation of a 3% Surf solution (Surf Field Mastitis Test) for the diagnosis of sub-clinical bovine and bubaline mastitis. Tropical Animal Health and Production, 42:457-464
- 51.Natzke, R.P., R.W.Everett and D.S.Postle.Normal milk somatic cell counts. J.Milk Fd.Technol. 35:261-263. 1972)
- 52.Oliver, B.M., Jayarao, S.P. & Almeida, R.A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. Foodborne Pathogens and Disease, 2(2): 115–129.
- 53.Ozay, G.; Seyham, F.; Pembeci, C.; Saklar, S. and Yilmaz, A. (2008). Factors influencing fungal and aflatoxins levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage, A 3-years study, Food Addit. Contam., 25 (2): 209-218.
- 54.Правилник за посебните барања за безбедност и хигиена на млеко и млечни производи (сл.весник на Р.М бр. 151/07)Parliament and of the Council of 29 April 2004laying down specific hygiene rules for food ofanimal origin.)
- 55.Prasad, R., Krishnaveni, C., Sundareshan, N., Akhila, D.S., Gomes, A.R. & Hegde, N.R. 2013. Incidence of sub-clinical mastitis and prevalence of major mastitis pathogens in organized farms and unorganized sectors. Indian Journal of Microbiology, 53(3): 315–320.
- 56.Park, D. L. (2002). Effect of processing on aflatoxin. Adv. Exp. Med. Bio.,504: 173-179.
- 57.Pohland, A. E.; & Yess, N. J. (1992). Food Contaminants: scientific and public health implications. Proceedings of the Nutrition Society of Australia, No. 17, pp. (1-12)
- 58.Pyorala, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Veterinary Research, 34: 565–578

Зоран Арсевски

- 59.Radostis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchkliff, K.W. (editors). 2000. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9th ed. ELBS & Baillier Tindall. See pp. 563–660.Regulation (EC) No 853/2004 of the European Reddy, S. V. and Waliyar (2008). Properties of aflatoxin and producing fungi, *Sperogillus* and Aflatoxin in groundnuts. International Crop Research, 3: 1-5.
- 60.Sandholm, M., T.H. Buzalski, L. Kaartinen, S.Pyorala. 1995. The bovine udder and mastitis.University of Helsinki, Faculty of VeterinaryMedicine, Helsinki.
- 61.Sharma, R. S.; Trivedi, K. R.; Wadodkar, U. R.; Murthy, T. N.; & Punjarath J. S. (1994). Aflatoxin B1 content in deoiled cakes, cattle feeds and damaged grains during different seasons in India. Journal of Food Science and Technology, Vol. 31, No. 3, pp (244-246)
- 62.Sharma,N., Maiti, S.K. & Sharma, K.K. 2007. Prevalence, etiology and antiobiogram of micro-organisms associated with sub-clinical mastitis in buffaloes in Durg, Chhattisgrh State (India). International Journal of Dairy Science, 2(2): 145–151
- 63.Shephard, G. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395, 1215e1224. Smith, K.L., Todhunter, D.A. & Schoenberger, P.S. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. Journal of Dairy Science, 68(6): 1531–1553
- 64.Stoloff, L.; Park, D. L.; & Van Egmond, H. P. (1991). Rationales for the establishments of limits and regulations for mycotoxins. Food Additives and Contaminants, No. 8, pp. (213-221)
- 65.T. G. Karmen and G. S. Teger, “The Microbiological Quality of Raw Milk after Introducing the Two Day’s Milk Collecting System,” Acta Agriculturae Slovenica, Vol. 92, No. 1, 2008, pp. 61-74.
- 66.Tiwari, A., Sisodia, R.S., Sharma, R.K., Misraulia, K.S. & Garg, U.K. 2000. Incidence of sub-clinical mastitis in cows of Malwa Region of Madhya Pradesh. Indian Journal of Dairy Science, 53(4): 328–331.

Зоран Арсевски

67. Tuinstra, L. G. M. T., Roos, A. H., & Van Trijp, J. M. P. (1993). Liquid chromatographic determination of aflatoxin M1 in milk powder using immunoaffinity columns for clean-up: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, Vol.76, pp. 1248- 1254
68. Van Egmond, H. P.; & Paulsch, W. E. (1986). Mycotoxins in milk and milk products. *Netherlands Milk Dairy Journal*, No. 40, pp. (175-188)
69. Van Egmond, H. P., Paulsch, W. E., & Schuller, P. L. (1978). Confirmatory test for aflatoxin M1 on thin layer plate. *Journal of AOAC*, Vol.61, No.4, pp. 809-812
70. Van Egmond, H. P. (1989b). Introduction. In: Van Egmond, H. P. (Ed.), *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 1–10.
71. Van Egmond, H. P. (1989a). Aflatoxin M1: occurrence, toxicity and regulation. In: Van Egmond, H.P. (Ed.), *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 11–55.
72. Veldman, A.; Meijs, J. A. C.; Borggreve, G. J. and Heeres-van-der-Tol, J. J. (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk, *Ann.Prod.*, 55, 163–168.
73. Whitlow, L. W. and Hagler, W. M. (2002). Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs*, 74 (28): 1-10.

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Зоран Арсевски

Зоран Арсевски

Определување на квалитет и присуство на афлатоксин во млеко од

Овчеполскиот Регион

Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип